DER PROTEINSYNTHESE-APPARAT VON MILCHSÄUREBAKTERIEN EINE STRUKTURELLE UND FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Michael Wasiliu
aus Stuttgart

1986

DER PROTEINSYNTHESE-APPARAT VON MILCHSÄUREBAKTERIEN EINE STRUKTURELLE UND FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Michael Wasiliu
aus Stuttgart

1986

Tag der mündlichen Prüfung: 2. 10. 1986

Dekan	:	Prof. Dr. W. Engels
1. Berichterstatter	:	Prof. Dr. H. Wolf
2. Berichterstatter	:	Prof. Dr. H. Zähner

Meinen Eltern

in

Dankbarkeit

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Wolf am Institut für Biologie II, Lehrbereich Mikrobiologie I, der Universität Tübingen durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, seine Anregungen und seine Unterstützung möchte ich Herrn Dr. Wolf sehr herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. H. Zähner danke ich für das Interesse an der Arbeit und die großzügige finanzielle Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Claudia Glöckner und Herrn Anselm Lehmacher für viele wichtige Anregungen und ihre ständige Diskussionsbereitschaft.

Meinen Mitarbeiterinnen Monika Mierzowski, Barbara Skorupinski und Ursula Wyputta, sowie meinem Mitarbeiter Nik Andres danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Den Mitarbeitern der Lehrbereiche Mikrobiologie I und II danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Abkürzungen

AA-tRNA	Aminoacyl-Transfer-Ribonukleinsäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bq	Becquerel
Ci	Curie
cpm	Impulse pro Minute
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
DNase	Desoxyribonuklease
E	Extinktion (Lichtweg 1 cm)
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EF	Elongationsfaktor
fMet-	N-Formyl-Methionyl-
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GMP-PCP	Guanylyl(β,γ-methylen)-diphosphonat
GMP-PNP	Guanylyl-imidodiphosphat
IF	Initiationsfaktor
L.casei	Lactobacillus casei
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
Phe	Phenylalanin
Poly(Phe)	Phenylalanin-Polypeptid
Poly(U)	Polyuridylsäure
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
ppGpp	Guanosin-3'-diphosphat-5'-diphosphat
RF	Terminationsfaktor
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
S 30	Überstand nach Zentrifugation eines Zellextraktes bei 30000 x g (20 min)
S	Svedbergeinheit
SDS	Dodecylsulfat, Natriumsalz
TCA	Trichloressigsäure
TPCK	N-Tosyl-L-Phenylalanylchlormethylketon

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit (Enzymeinheit)

Weitere Abkürzungen sind im Text erklärt.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Material und Methoden	11
II.1	Chemikalien, Enzyme, Antibiotika	11
II.2	Nährmedien und Puffer	13
II.3	Versuchsorganismen	14
II.4	Analytische Methoden	14
II.5	Isolierung und Reinigung der Elongationsfaktoren EF-G und EF-Tu aus L.casei	19
II.6	Partielle Reinigung von EF-Ts aus L.casei	21
II.7	Isolierung und Reinigung der Elongationsfaktoren EF-G und EF-Tu aus E.coli MRE 600	22
II.8	Präparation von 70S Ribosomen	23
II.9	Essigsäure-Extraktion ribosomaler Proteine	24
II.10	Darstellung von Phe-tRNA und [^{14}C]-Phe-tRNA	25
II.11	Isolierung von Phe-tRNA-Synthetase aus E.coli MRE 600	25
II.12	Testsysteme zum Nachweis und zur Charakterisierung der Elongationsfaktoren	25
III.	Ergebnisse	33
III.1	Zweidimensionale Gelelektrophorese von 70S Proteinen	33
III.2	Gradientengelelektrophorese von rRNA	34
III.3	Reinigung von EF-G und EF-Tu aus L.casei	35
III.4	Strukturelle Charakterisierung der Elongationsfaktoren	40
III.5	Funktionelle Charakterisierung von EF-G	45
III.6	Antibiotika-Empfindlichkeit des Elongationsapparates von L.casei	48

Seite

III.7 Untersuchungen zur Fusidinsäure-Resistenz von EF-G aus L.casei 53

III.8 Untersuchungen zur Interaktion zwischen EF-G (L.casei) und tRNA 58

IV. Diskussion 62

V. Zusammenfassung 82

VI. Literatur 84

VII. Anhang 103

I. EINLEITUNG

Nach den klassischen Modellvorstellungen über den Ablauf der Proteinbiosynthese erfolgt die Verlängerung der Polypeptidkette im Elongationscyclus als Folge dreier aufeinanderfolgender Teilreaktionen (WATSON,1964; LIPMANN,1969):
- Codonerkennung und Bindung der Aminoacyl-tRNA
- Transpeptidierung und
- Translokation.

Schon 1964 postulierte WATSON hierfür auf dem 70S Ribosom zwei tRNA-Bindungsstellen; die Aminoacyl-Site (A-Site) und die Peptidyl-Site (P-Site). Beide Bindungsstellen können funktionell durch ihre Reaktivität gegenüber dem Hemmstoff Puromycin unterschieden werden (MONRO et al.,1969).
Dieses Zwei-Bindungsstellen-Modell bildet bis heute die Grundlage für unsere Vorstellungen vom molekularen Ablauf des Elongationscyclus. Erst in neuerer Zeit wurden Ribosomen-Modelle vorgeschlagen, die weitere tRNA-Bindungsstellen enthalten (GRAJEVSKAJA,1982; RHEINBERGER et al.,1983; 1983a; NIERHAUS et al.,1984).

Nach der Initiation der Proteinbiosynthese besetzt die Initiations-fMet-$tRNA_f^{Met}$ die P-Site des 70S Ribosoms. Die benachbarte A-Site ist bereit, die erste Aminoacyl-tRNA codonspezifisch zu binden und so den Elongationscyclus einzuleiten (GRUNBERG-MANAGO,1980; SPIRIN,1986). Die Aminoacyl-tRNA kann jedoch nicht direkt an die A-Site binden,sondern muß zu diesem Zweck einen ternären Komplex mit dem Elongationsfaktor Tu (bei Eukaryonten EF-1) und einem Molekül GTP eingehen (ERTEL et al.,1968; 1968a; RAVEL et al.,1967). EF-Tu stellt bei E.coli ein labiles, monomeres Protein vom Molekulargewicht 43225 dar, dessen Polypeptidkette aus 393 Aminosäuren gebildet wird (ARAI et al., 1980).
Der Elongationsfaktor Tu zeigt, wie auch andere wichtige lösliche Faktoren der Proteinbiosynthese eine hohe Affinität zu

Guaninnukleotiden. GDP besitzt hier eine um eine Größenordnung höhere Affinität als GTP. Beide Guaninnukleotide, die durch eine Sulfhydrylgruppe in Position 137 an dieselbe Bindungsstelle anlagern, wirken hierbei als allosterische Effektoren, die die Konformation und damit die Reaktivität des Elongationsfaktors bestimmen (CRANE et al.,1974; ARAI et al.,1975; 1976; 1977; WILSON et al.,1978). Nur GTP (oder nichthydrolysierbare Strukturanaloga wie GMP-PCP bzw. GMP-PNP) induziert die Konformation von EF-Tu, die zur Bildung des ternären Komplexes EF-Tu·GTP·AA-tRNA erforderlich ist (KAZIRO,1978).
EF-Tu·GTP zeigt eine Spezifität für AA-tRNA; deacylierte tRNA oder N-blockierte Aminoacyl-tRNA werden nicht gebunden (SPRINZL et al.,1979). Bei passender Codon-Anticodon-Paarung bindet der ternäre Komplex an die A-Site des Ribosoms. Dies induziert eine EF-Tu-abhängige GTP-Hydrolyse. Die Affinität des Elongationsfaktors zur AA-tRNA und zum Ribosom reduziert sich, EF-Tu·GDP verläßt das Ribosom, und mit Hilfe des Elongationsfaktors Ts wird der EF-Tu·GTP-Komplex anschließend regeneriert (CHAU et al.,1981).
Nach Ablauf des ersten Teilschrittes der Elongation besetzt die Initiations-fMet-tRNA$_f^{Met}$ (bzw. die Peptidyl-tRNA) die P-Site und die Aminoacyl-tRNA die A-Site des Ribosoms. Die 3'-Enden beider tRNA-Moleküle befinden sich hierbei in unmittelbarer Nachbarschaft zum Peptidyltransferase-Zentrum, das einen integralen Bestandteil der 50S Untereinheit darstellt (HARRIS et al.,1977; KRAYEVSKY et al.,1979).
Durch einen nukleophilen Angriff der Aminogruppe der AA-tRNA auf die Carbonylfunktion der Esterbindung der Peptidyl-tRNA bildet sich eine neue Peptidbindung aus, und die Polypeptidkette wird so um eine Aminosäure verlängert. Durch Kenntnis der Wirkungsweise von Serinproteasen wurden Modellsysteme für die Transpeptidierung entwickelt, nach denen die Histidinreste mehrerer ribosomaler Proteine an der Katalyse beteiligt sind. Alle Versuche, ein Acyl-Ribosomen-Intermediärprodukt zu isolieren, blieben jedoch erfolglos. Die freie Energie von ca. -7kcal/Mol, die bei der Spaltung der Esterbindung der Aminoacyl-tRNA frei wird, kann für die Bindung der AA-tRNA oder

die nachfolgende Translokation verwendet werden und somit den gesamten Elongationscyclus antreiben (SPIRIN,1985).
Die Translokation vollendet die Elongationsreaktion und stellt die anfänglichen Bindungsverhältnisse auf dem Ribosom wieder her. Die Peptidyl-tRNA wechselt hierbei auf die P-Site, wo sie wieder als Peptidyl-Donor fungieren kann; die deacylierte tRNA verläßt das Ribosom, und die mRNA wandert um ein Codon in Richtung ihres 3'-Endes, so daß ein neues Triplett-Codon an der A-Site erscheint.
Die Translokation wird durch den Elongationsfaktor G (bei Eukaryonten EF-2) katalysiert, der sich wie schon EF-Tu durch Interaktion mit Guaninnukleotiden und seine GTPase-Aktivität auszeichnet (NISHIZUKA et al.,1966).
Der Elongationsfaktor G aus E.coli stellt eine einzelne Polypeptidkette aus 701 Aminosäuren mit einem ungefähren Molekulargewicht von 80000 dar, dessen Primärstruktur aufgeklärt werden konnte (OVCHINIKOV et al.,1982). In der Genkarte von E.coli liegt das Strukturgen fus des Elongationsfaktors G in unmittelbarer Nachbarschaft zum tufA-Gen des EF-Tu (ISONO, 1980).
Die Bildung eines EF-G·GTP-Komplexes ist, obwohl GTP schwächer bindet als beim EF-Tu, und der entstandene EF-G·GTP-Komplex leicht zerfällt, die Voraussetzung für die Bindung des Elongationsfaktors G an das Ribosom. Es konnte jedoch kein langlebiger Komplex zwischen EF-G·GTP und einem Ribosom im Pretranslokations-Zustand nachgewiesen werden. Vielmehr scheint unmittelbar nach Bindung von EF-G·GTP die Translokation induziert zu werden. Hierauf folgt die Hydrolyse von GTP, wobei die GTPase-Aktivität zwar dem Elongationsfaktor zugeschrieben wird, aber offensichtlich der Wechselwirkung mit dem Ribosom bedarf. GDP ist nun nicht in der Lage, die Bindung von EF-G zum Ribosom im Posttranslokations-Zustand aufrechtzuerhalten. EF-G und GDP verlassen das Ribosom, das jetzt für eine neue Runde des Elongationscyclus zur Verfügung steht. Beide Guaninnukleotide erfüllen auch hier die Funktion allosterischer Faktoren, die die Affinität von EF-G zum Ribosom kontrollieren.

Während des Wechsels der Peptidyl-tRNA auf die P-Site und der simultanen Bewegung der mRNA bleibt die Paarung zwischen Codon und Anticodon der Peptidyl-tRNA erhalten. Mutierte tRNA mit einem Nukleotid-Quadruplett anstelle eines Tripletts als Anticodon konnte eine (+1)-frameshift-Mutation unterdrücken. Der Wechsel der Peptidyl-tRNA scheint folglich der aktive Teil der Translokationsreaktion zu sein (RIDDLE et al.,1973; MATZKE et al.,1980).
Niedrige Mg^{2+}-Konzentrationen stimulieren die Translokation und können den Effekt von EF-G und GTP praktisch restlos ersetzen (BELITSINA et al.,1979). Die Besetzung der A-Site scheint jedoch eine Voraussetzung für die Freisetzung von deacylierter tRNA während der Translokation zu sein (KAJI et al.,1969; LUCAS-LENARD et al.,1969).

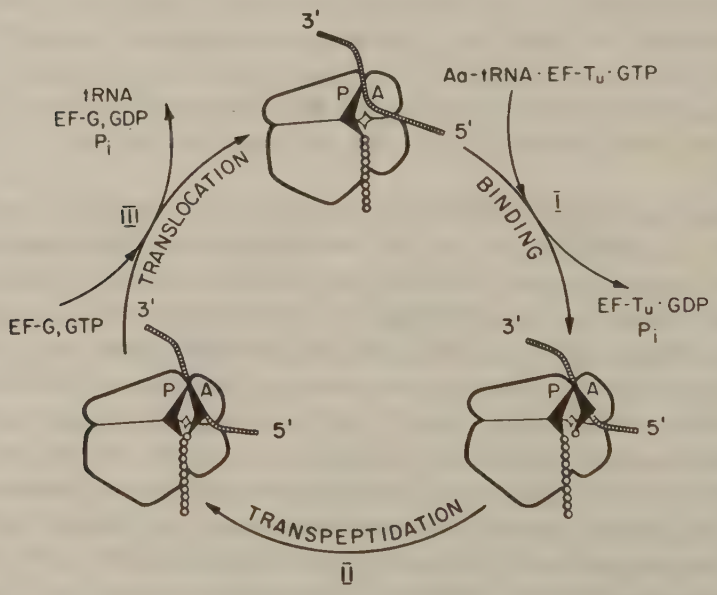


Abb.1: Schematischer Ablauf des Elongationscyclus in der Proteinbiosynthese (nach SPIRIN,1986).

Um die Translokation qualitativ und quantitativ zu erfassen, gibt es mehrere Meßmethoden (TRAUT et al.,1964; ERBE et al., 1968; HAENNI et al.,1968; LUCAS-LENARD et al.,1969; GUPTA et al.,1971):

- Puromycin kann als niedermolekulares Analogon der Aminoacyl-tRNA als Akzeptor in der Peptidyltransferase-Reaktion dienen. Die Peptidyl-tRNA eines Ribosoms im Posttranslokations-Zustand kann mit Puromycin reagieren, Peptidyl-Puromycin verläßt das Ribosom. Eine Peptidyl-tRNA im Pretranslokations-Zustand geht keine Reaktion mit Puromycin ein, so daß die freigesetzte Menge an Peptidyl-Puromycin als quantitatives Maß für den Posttranslokations-Zustand der Ribosomen angesehen werden kann.
- Die Fähigkeit des Ribosoms, markierte Aminoacyl-tRNA codonspezifisch zu binden, kann dazu herangezogen werden, den Pretranslokation- und Posttranslokations-Zustand zu unterscheiden. Unmittelbar nach der Transpeptidierung kann das Ribosom keine Aminoacyl-tRNA binden; dies ist erst nach erfolgter Translokation in die nun frei gewordene A-Site möglich.
- Während der Translokation wird deacylierte tRNA freigesetzt, die bei entsprechender Markierung nachgewiesen werden kann.
- Der Nachweis der Bewegung der mRNA über die codonspezifische Bindung einer Aminoacyl-tRNA oder den durch das Ribosom vermittelten Schutz vor nukleolytischem Abbau ist die technisch aufwendigste Methode die Translokation zu erfassen.

Durch Verwendung spezifischer Antikörper gegen verschiedene ribosomale Proteine und durch Anwendung der Immun-Elektronen-Mikroskopie konnte die Bindungsstelle von EF-G auf dem Ribosom lokalisiert werden (HAMEL et al.,1972; HIGHLAND et al.,1973; KOTELIANSKY et al.,1977; GIRSHOVICH et al.,1982). Antikörper gegen die Proteine L7/L12 der 50S Untereinheit hemmen die Bindung von EF-G. Entfernen dieser Proteine verhindert die Bindung jedoch nicht völlig. Offensichtlich ist als weitere Strukturkomponente an der Bindung von EF-G eine Teilsequenz der 23S-RNA beteiligt, wie durch Aufklärung der Wirkungsweise und Bindungsstelle von Thiostrepton nachgewiesen werden konnte.

Immunelektronenmikroskopische Methoden lokalisieren EF-G an der Basis des Stiels der 50S Untereinheit (GIRSHOVICH et al., 1981). Die Quervernetzung mit Protein S12 der 30S Untereinheit spricht für die Lokalisation der Bindungsstelle im Kontaktbereich beider Untereinheiten (GIRSHOVICH et al.,1981a). Für EF-Tu wurden dieselben Ergebnisse erzielt. Darüberhinaus verhindert die vorherige Bindung von EF-G in Gegenwart von GTP und Fusidinsäure oder nichthydrolysierbaren Analoga die Bindung des ternären Komplexes EF-Tu·GTP·AA-tRNA.
Der Initiationsfaktor IF-2 und der Terminationsfaktor RF konkurrieren ebenfalls mit EF-G um diese Bindungsstelle. Alle Proteinsynthesefaktoren mit GTP-Hydrolyse-Aktivität binden so an eine identische Bindungsstelle auf der 50S Untereinheit.

Der Ablauf der Translokation wurde lange Zeit als Beispiel eines mechanochemischen Systems betrachtet, bei dem die EF-G-abhängige GTP-Hydrolyse die Energie für die Bewegung der tRNA bzw. der mRNA liefern sollte. Die ATP-Spaltung bei der Muskelkontraktion galt als eindrucksvolles Vorbild. Die freie Energie der Hydrolyse der Esterbindung während der Transpeptidierung reicht jedoch völlig aus, um den Energiebedarf des Elongationscyclus zu decken. Thermodynamisch besteht keine Notwendigkeit zur Hydrolyse von GTP durch EF-G und EF-Tu.
Die Entdeckung der nichtenzymatischen Proteinbiosynthese zeigte, daß, obwohl mit geringerer Geschwindigkeit, auch ohne EF-G und EF-Tu ein faktorenfreier Elongationscyclus möglich ist (GAVRILOVA et al.,1976; RUTKEVITCH et al.,1982). EF-G ist im Komplex mit nichthydrolysierbaren GTP-Analogen in der Lage, eine normale Translokation zu katalysieren (INOUE-YOKOSAWA et al., 1974; BELITSINA et al.,1975; MODOLELL et al.,1975). EF-Tu bildet mit GMP-PCP oder GMP-PNP sowie AA-tRNA ternäre Komplexe, die an die ribosomale A-Site binden (KAZIRO,1978).
Die Guaninnukleotide scheinen vielmehr auch bei den anderen in der Proteinbiosynthese beteiligten Faktoren mit GTPase-Aktivität nur als allosterische Effektoren zu dienen. Durch die Komplexbildung mit GTP und dessen Hydrolyse wird die alternative Bindung und Ablösung der Faktoren an der ribosomalen Bindungsstelle kontrolliert.

Die Fähigkeit zur Translokation kann als eine dem Ribosom eigene Aktivität angesehen werden. Dies kann durch gegenseitige Bewegung der beiden Untereinheiten zustande kommen (SPIRIN, 1969). Über die Rolle, die EF-G demnach bei der Translokation erfüllt, kann bislang nur spekuliert werden.

Antibiotika sind nicht nur aus human- und veterinärmedizinischer Sicht von enormer Bedeutung, sondern stellen vielfach auch Mittel dar, mit deren Hilfe in der biochemischen Forschung Einsichten in bislang unbekannte Reaktionsabläufe gewonnen werden konnten. Ein Großteil des bis heute bekannten Ablaufs der Proteinbiosynthese konnte erst durch die Aufklärung der Wirkungsweisen von Antibiotika und Hemmstoffen oder durch Untersuchung antibiotikaresistenter Wirkorte erstellt werden. Für nahezu alle in der Proteinbiosynthese angreifenden Antibiotika stellt das Ribosom aufgrund seiner komplexen Struktur den eigentlichen Wirkort dar. Es gibt nur drei Antibiotika, die auf einen beteiligten löslichen Faktor wirken:

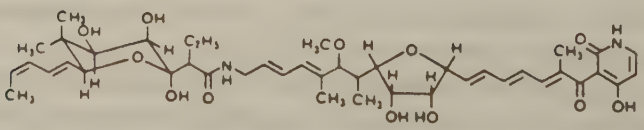
- Kirromycin wurde aus der Kulturflüssigkeit von Streptomyces collinus isoliert und zeigte sich als mit Mocimycin aus Streptomyces ramocissimus identisch. In den folgenden Jahren wurde eine Vielzahl weiterer Kirromycin-Derivate beschrieben (WOLF et al.,1972; 1983).
  Kirromycin bindet an den Elongationsfaktor Tu und wirkt hierbei wie ein allosterischer Effektor. Unabhängig vom tatsächlich gebundenen Guaninnukleotid induziert Kirromycin die Konformation, die der von EF-Tu·GTP entspricht. Nach Bindung des ternären Komplexes und erfolgter GTP-Hydrolyse bleibt somit EF-Tu·GDP Kirromycin am Ribosom gebunden, der nachfolgende Peptidyltransfer bleibt aus, und der Elongationscyclus bricht ab (WOLF et al.,1974).
- Pulvomycin aus Streptoverticillium mobaraense und das strukturidentische Labilomycin aus Streptomyces albosporeus hemmen die Elongation ebenfalls durch Bindung an EF-Tu (ZIEF et al.,1957; WOLF et al.,1978; ASSMANN et al.,1979).
  Hierbei wird eine EF-Tu·GDP entsprechende Konformation hervorgerufen, so daß der ternäre Komplex nicht mehr gebildet

werden kann. Der Elongationscyclus kommt durch die eintretende Substratverarmung zum Stillstand.

Kirromycin und Pulvomycin binden wahrscheinlich an unterschiedliche Stellen des Elongationsfaktors Tu; Pulvomycin kann jedoch Kirromycin an dessen Bindungsstelle ersetzen (PINGOUD et al.,1982).

- Fusidinsäure ist ein von Fusidium coccineum produziertes Steroid-Antibiotikum, das in zellfreien Systemen aus Pro- und Eukaryonten aktiv ist (GODTFREDSEN et al.,1962). Durch Bindungsstudien mit Tritium-markierter Fusidinsäure wurde der Elongationsfaktor G als Wirkort bestimmt (OKURA et al.,1970; 1971). Ebenso zeigen fusidinsäureresistente Mutanten einen veränderten Elongationsfaktor G (KINOSHITA et al.,1968; BERNARDI et al.,1970).
Fusidinsäure hemmt die von EF-G bzw. EF-2 abhängige GTP-Hydrolyse. In Gegenwart von Ribosomen, EF-G und GTP bildet das Antibiotikum stabile {Fusidinsäure·EF-G·GDP·Ribosomen}-Komplexe (BODLEY et al.,1969). Der eigentliche Effekt ist jedoch nicht die Hemmung der Translokation, denn mit Fusidinsäure behandelte Polysomen tragen ihre wachsenden Polypeptidketten in einer Puromycin-reaktiven Stellung (CELMA et al., 1972). Die Bildung des Fusidinsäure-Komplexes verhindert jedoch die Anlagerung von EF-Tu an die gemeinsame ribosomale Bindungsstelle. Die Bindung der Aminoacyl-tRNA ist somit der eigentliche, durch Fusidinsäure gehemmte Teilschritt des Elongationscyclus (BODLEY et al.,1970; CUNDLIFFE,1972).

A



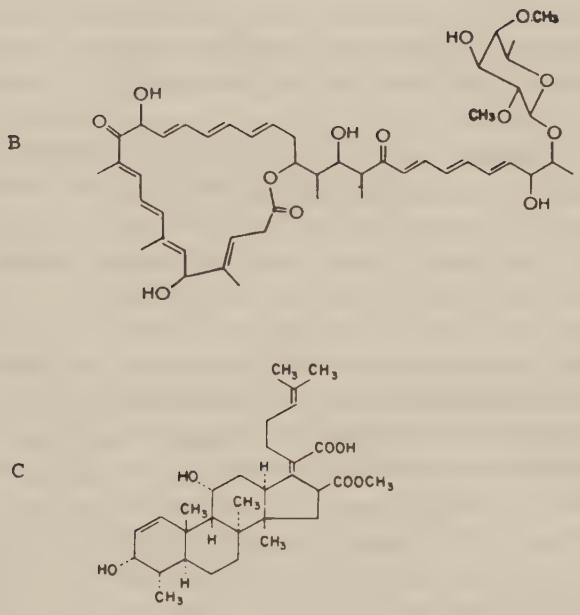


Abb.2: Strukturformeln der Antibiotika Kirromycin (A), Pulvomycin (B) und Fusidinsäure (C)

Alle grundlegenden Erkenntnisse über Struktur und Funktionsweise des Proteinsynthese-Apparates wurden an Escherichia coli als Versuchsorganismus gewonnen. Wesentliche Funktionsabläufe wie z.B. die Translokation sind jedoch in ihren molekularen Grundlagen nicht verstanden und Ansätze, diesen ungelösten Problemen beizukommen, nicht in Sicht. Dabei wird stillschweigend vorausgesetzt, daß der Ablauf der Proteinbiosynthese und seine strukturellen Komponenten bei allen Prokaryonten identisch oder zumindest mit dem von E.coli vergleichbar ist. Daß dem nicht so sein muß, zeigte ein Vergleich des Elongationsfaktors Tu bei Eubakterien (WÖRNER et al.,1983).
Zwar erwiesen sich alle EF-Tu-Spezies als mit E.coli Ribosomen kompatibel, doch v.a. die Elongationsfaktoren der Milchsäurebakterien unterschieden sich durch veränderte Ligandenaffinitäten merklich von dem aus E.coli.

Die Untersuchung der Proteinbiosynthese bei solchen Organismen mit 'ungewöhnlichen' Eigenschaften könnte letztlich zu einem besseren Verständnis der Translation beitragen. Der Elongationsapparat von Lactobacillus casei als Vertreter der homofermentativen Streptobakterien sollte aus diesem Grund umfassender untersucht werden. Die Elongationsfaktoren G und Tu, sowie die Ribosomen dieses Vertreters der Milchsäurebakterien, sollten strukturell und funktionell näher charakterisiert werden. Interessant erschien hierbei v.a. das Auffinden weiterer Antibiotika-Resistenzen.
Eine eingehendere Untersuchung von Milchsäurebakterien wäre auch aufgrund ihrer großen wirtschaftlichen Bedeutung von Interesse. Trotz der breiten Anwendung in der klassischen Biotechnologie (besonders der Lebensmitteltechnik) ist über die molekularbiologischen Eigenschaften der Milchsäurebakterien mit Ausnahme ihrer Gärungsmechanismen kaum etwas bekannt. Erst in den letzten Jahren stieg das Interesse an der Genetik von Milchsäurebakterien, und mittlerweile sind die grundlegenden Methoden zur gentechnischen Veränderung von Milchsäurebakterien vorhanden (TEUBER,1986).

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien, Enzyme, Antibiotika

Chemikalien für Nährmedien

Malzextrakt; Bacto-Agar; Bacto-Tryptone (Difco, Detroit, Mich., USA); Pepton aus Casein, tryptisch verdaut; D-Glukose; K_2HPO_4 x $3H_2O$; Natriumacetat; Diammoniumhydrogencitrat; $MgSO_4$ x $7H_2O$; $MnSO_4$ x H_2O; Natriumchlorid (Merck, Darmstadt); Fleischextrakt; Hefeextrakt (Oxoid, Wesel); Tween 80 (Serva, Heidelberg).

Chemikalien für Gelelektrophoresen

Riboflavin; N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (Bio-Rad, München); Carboanhydrase; Creatinkinase; Fumarase; Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase; Phosphorylase b; Pyruvatkinase; Trypsininhibitor aus Sojabohnen (Boehringer, Mannheim); Agarose (BRL, Rockville, USA); Comassie Brilliant Blue; Natriumdodecylsulfat; N,N'-Methylenbisacrylamid (Serva, Heidelberg); Borsäure; α-Chymotrypsinogen; β-Lactoglobulin; Lysozym; Myoglobin; Rinderserumalbumin; Toluidinblau (Sigma, München).

Chemikalien für Isoelektrische Fokussierung

Servalyt-Precotes pH 4-7; Protein-Testmischung 9; Serva Blau G; Anodenflüssigkeit 3; Kathodenflüssigkeit 10 (Serva, Heidelberg).

Radiochemikalien

$[^3H]$-GDP, 14,4Ci/mMol (533GBq/mMol)
γ-$[^{32}P]$-GTP, 30Ci/mMol (1110GBq/mMol)
$[^{14}C]$-Phenylalanin, 522mCi/mMol (19,3GBq/mMol)
(Amersham Buchler, Braunschweig)

Gelmaterialien

Ultrogel AcA 44 (LKB, Bromma, Schweden); CM-Sepharose Cl-6B; DEAE-Sepharose Cl-6B; Phenyl-Sepharose Cl-4B; Sephadex G 25 fine; Sephadex G 100 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden).

Chemikalien und Enzyme für *in vitro*-Testsysteme

ATP; GDP; GTP; Phospho*enol*pyruvat; Pyruvatkinase; tRNA aus E.coli MRE 600; Trypsininhibitor aus Sojabohnen (Boehringer, Mannheim); TPCK-behandeltes Trypsin (Millipore Corp.,Freehold, USA); N-Ethylmaleimid; Rinderserumalbumin kristallisiert (Sigma, München); EF-Tu und EF-G aus E.coli MRE 600 (isoliert nach WÖRNER,1982); Ribosomen aus E.coli MRE 600 (isoliert nach STAEHLIN und MAGLOTT,1971); Phe-tRNA-Synthetase aus E.coli MRE 600 (isoliert nach STULBERG,1967); Phe-tRNA und [^{14}C]-Phe-tRNA (hergestellt nach VOORMA et al.,1971).

Antibiotika

Kirromycin (isoliert nach WOLF und ZÄHNER,1972); Pulvomycin (isoliert nach ASSMANN und WOLF,1979); Tetracyclin-Hydrochlorid (Boehringer, Mannheim); Thiostrepton (von Heyden GmbH, Regensburg); Viomycin (Chas. Pfizer & Co GmbH, Hamburg); Kanamycin-Sulfat; Tylosin-Tartrat (Serva, Heidelberg); Anisomycin; Cycloheximid; Chloramphenicol; Emetin-Dihydrochlorid; Erythromycin; Fusidinsäure-Natriumsalz; Gentamycin-Sulfat; Mikamycin A+B; Neomycin-Sulfat; Puromycin-Dihydrochlorid; Ricin (Agglutinin Ricinus communis); Spectinomycin-Dihydrochlorid; Streptomycin-Sulfat; Tobramycin; Virginiamycin M_1 (Sigma, München).

Sonstiges

Ultrafiltrationsmembranen (Amicon, Witten); Phenylmethylsulphonylfluorid (Boehringer, Mannheim); Zellulosenitratfilter SM

11306, ø 25mm, Porengröße 0,45µm (Sartorius, Göttingen), Aluminiumoxid Alcoa A 305; Sucrose, DNA- und RNA-frei (Serva, Heidelberg); Desoxyribonuklease I (Sigma, München); Whatman 3MM Papierfilter, ø 25mm (Vetter, Wiesloch); Quickszint 402 (für wässriges Material); Quickszint 501 (für nichtwässriges Material); Szintillationsfläschchen (Zinsser, Frankfurt).

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden in analysenreiner Qualität von Merck, Darmstadt bezogen.

2. Nährmedien und Puffer

Nährmedien

Für die Anzucht von Lactobacillus casei wurde das MRS-Medium (DE MAN et al.,1960) verwendet,das zur Züchtung sämtlicher Lactobacillus-Spezies geeignet ist:

10g Pepton aus Casein, 5g Fleischextrakt, 5g Hefeextrakt, 20g Glukose, 1g Tween 80, 2,6g $K_2HPO_4x3H_2O$, 5g Natriumacetat, 2g Diammoniumhydrogencitrat, 0,2g $MgSO_4x7H_2O$, 50mg $MnSO_4xH_2O$; ad 1 L entionisiertes Wasser (pH 6,2 - 6,5).

Für die Anzucht von Escherichia coli MRE 600 diente folgendes TN-Medium:

13g Bacto-Tryptone, 7g NaCl; ad 1 L entionisiertes Wasser (pH 7,0).

Die Anzucht von Nematospora coryli erfolgte mit HM-Medium:

10g Malzextrakt, 4g Hefeextrakt, 4g Glukose; ad 1 L entionisiertes Wasser (pH 7,5).

Nährmedien wurden 20 min bei 120°C im Autoklaven sterilisiert. Für feste Nährböden wurden 20g Bacto-Agar pro Liter Nährlösung zugesetzt.

Puffer

Standardpuffer SP10:

60 mM Tris·HCl pH 7,6, 30 mM NH_4Cl, 30 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 0,5 mM EDTA, 5 mM Mercaptoethanol

Waschpuffer:

10 mM Tris·HCl pH 7,6, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM NH_4Cl

3. Versuchsorganismen

Stamm	Nährmedium	Wachstumsbedingungen
Escherichia coli MRE 600	TN	37°C
Lactobacillus casei DSM 20312	MRS	30°C†
Nematospora coryli ATCC 10647	HM	27°C
		(†=anaerob)

Die Abkürzungen von Kultursammlungen bedeuten:

DSM Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, München
MRE Microbiological Research Establishment, Porton, Nr Salisbury, Wiltshire, England
ATCC American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA

4. Analytische Methoden

A. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der von LOWRY et al. (1951) beschriebenen Methode. Mit Albumin aus Rinderserum wurde eine Eichkurve erstellt.

B. Leitfähigkeitsmessung

Der Verlauf von Ionenstärkegradienten wurde mit einem Leitfähigkeitsmesser (Typ CDM 2e, Radiometer A/S, Copenhagen, Denmark) bestimmt.

C. Radioaktivitätsbestimmung

Die an Nitrocellulose bzw. Papierfilter adsorbierte Radioaktivitätsmenge wurde mit 3 ml Toluolszintillator Quickszint 501 in Szintillationsfläschchen mittels eines Flüssigszintillationsspektrometer (1219 Rackbeta, LKB, Turku, Finland) bestimmt. Die Zählausbeute betrug für [^{3}H] 62% und für [^{14}C] 96%. [^{32}P] wurde als Phosphomolybdato-Komplex nach derselben Methode in einem Flüssigszintillationsspektrometer (LS 6800, Beckman, Irvine, California, USA) bestimmt. Die Zählausbeute für [^{32}P] betrug 100%.

D. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophoresen wurden wie bei LÄMMLI (1970) beschrieben durchgeführt.
Die Proben wurden entweder direkt oder nach Fällung mit abs. Ethanol in Probenpuffer zu einer Proteinendkonzentration von 1 mg/ml aufgenommen. Die resuspendierten Proben wurden ca. 5 min bei 95°C in einem Eppendorf-Thermostat 5320 erhitzt.
Bei der verwendeten Elektrophorese-Apparatur handelte es sich um das Screening Electrophoresis System 'Havana' von Desaga mit Doppeltrennzelle für zwei Gele (1,5 x 110 x 110 mm).
Die folgenden Eichproteine (Molekulargewicht) wurden verwendet: Phosphorylase b (97000), Rinderserumalbumin (68000), Pyruvatkinase (57000), Fumarase (49000), Creatinkinase (40500), Glycerinaldehydphosphat-Dehydroganase (36000), Carboanhydrase (29000), α-Chymotrypsinogen (25000), Trypsininhibitor aus Sojabohnen (21000), β-Lactoglobulin (18400), Lysozym (13400).
Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA pro Doppeltrennzelle; die Spannung stieg während der Elektrophorese von 55 Volt auf 130 Volt.
Fixieren und Anfärben der Gele mit Comassie Brilliant Blue erfolgte nach FAIRBANKS (1971). Entfärbt wurde mit 10% Eisessig.

E. Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die ribosomalen 70S Proteine wurden nach der Methode von KALTSCHMIDT und WITTMANN (1970) getrennt.
Trenngel 1. Dimension (8% / pH 8,6):

36g Harnstoff, 8g Acrylamid, 0,3g Bisacrylamid, 0,8g Na_2-EDTA, 3,2g Borsäure, 4,85g Tris, 0,3ml TEMED;
mit H_2O bidest auf 99,4ml auffüllen. Zur Polymerisation werden 0,6ml einer frisch zubereiteten Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (7%) zugesetzt.

Probengel:

48g Harnstoff, 4g Acrylamid, 0,2g Bisacrylamid, 85mg Na_2-EDTA, 0,32g Borsäure, 60µl TEMED;
mit H_2O bidest. auf 99ml auffüllen.Zur Polymerisation wird 1ml einer Lösung zugesetzt, die 0,5mg Riboflavin und 5mg Ammoniumperoxodisulfat enthält.

Elektrodenpuffer 1. Dimension (pH 8,6):

360g Harnstoff, 2,4g Na_2-EDTA, 9,6g Borsäure, 14,55g Tris; ad 1 L entionisiertes Wasser.

Dialysierpuffer:

480g Harnstoff, 0,74ml Eisessig, 2,4ml KOH (5N); ad 1 L entionisiertes Wasser.

Trenngel 2. Dimension (18% / pH 4,6):

360g Harnstoff, 180g Acrylamid, 5g Bisacrylamid, 52,3ml Eisessig, 9,6ml KOH (5N), 5,8ml TEMED;
mit H_2O bidest auf 967ml auffüllen.Zur Polymerisation werden 33ml einer Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (5%) zugesetzt.

Elektrodenpuffer 2. Dimension (pH 4,6):

140g Glycin, 15ml Eisessig; ad 10 L entionisiertes Wasser.

Die Elektrophorese der ribosomalen Proteine erfolgte in der ersten Dimension in 120mm langen Glasröhrchen (Innendurchmesser 4mm). Diese wurden bis zu Mitte mit Trenngel gefüllt. Je 1,5mg lyophilisierte 70S Proteine wurden in 100µl Probengel gelöst und aufpolymerisiert. Zur Markierung der Ionenfront wurde dem Probengel Bromphenolblau bzw. Pyronin Y zugesetzt. Anschließend wurden die Röhrchen mit Trenngel aufgefüllt. Die Elektrophorese erfolgte in der schon erwähnten Apparatur 'Havana' von Desaga über eine Dauer von 8 Stunden bei einer konstanten Stromstärke von 2 mA pro Röhrchen.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele aus den Röhrchen entfernt und zur Vorbereitung auf die zweite Dimension mehrere Stunden dialysiert.
Die Trennung in der zweiten Dimension wurde in einer Doppeltrennzelle (3,5 x 110 x 110 mm) durchgeführt. Die Gelkammern wurden mit dem entsprechenden Trenngel gefüllt und die Röhrchengele der ersten Dimension aufpolymerisiert. Die Elektrophorese erfolgte über eine Zeit von 14 Stunden bei einer Gesamtspannung von 100 Volt/Doppeltrennzelle.
Fixieren und Anfärben der Gele erfolgte wie bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach der Methode von FAIRBANKS (1971). Entfärbt wurde mit 10% Eisessig.

F. Polyacrylamid-Gradienten-Gelelektrophorese

Die Trennung von ribosomaler RNA erfolgte nach der Methode von AMILS et al. (1979) mittels Polyacrylamid-Gradientengelen (2-15%).

Elektrophoresepuffer:

36 mM Tris·HCl pH 7,7, 23 mM Tris-Natriumphosphat-12-hydrat, 1 mM EDTA, 0,2% Natriumdodecylsulfat

Färbelösung:

0,1% Toluidinblau in 1% Eisessig, 30% Methanol

Entfärbelösung:

1% Eisessig, 20% Methanol

Die Kammern der 'Havana' Elektrophorese-Apparatur (1,5 x 110 x 110 mm) wurden mit Polyacrylamid (15%) abgedichtet. Anschließend wurde mit Hilfe eines Gradientenmischers das Gradientengel gegoßen. Die Geltaschen für den Probenauftrag wurden mit Agarose (1%) hergestellt.
Je eine A_{260}-Einheit 70S Ribosomen in 10µl Probenpuffer wurden in SDS (1%) für 2 min bei 70°C inkubiert,auf Eis gestellt

und aufgetragen. Zur Markierung der Ionenfront wurde Bromphenolblau zugesetzt.
Die elektrophoretische Trennung erfolgte über eine Dauer von ca. 5 Stunden bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA.
Die Gele wurden 5 min lang in Färbelösung gelegt und anschließend entfärbt.

G. Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurde unter Verwendung von Servalyt-Precotes pH 4-7 (125 x 125 mm), einer Mediphor-Kammer und einem Netzgerät Desatronic 2000/300 der Fa. Desaga bei 4°C durchgeführt.
Die Elektrodendochte wurden mit Anodenflüssigkeit 3 (0,83g Asparaginsäure, 0,92g Glutaminsäure in 250ml entionisiertem Wasser) bzw. Kathodenflüssigkeit 10 (36ml Ethylendiamin, 1,09g Arginin, freie Base; 0,91g Lysin, freie Base in 250ml entionisiertem Wasser) getränkt und überschüßige Flüssigkeit mit Filterpapier aufgesaugt. Nach Auflegen der Elektrodendochte auf das Precote wurden die Proben mit Hilfe eines Applikatorstreifens aufgetragen. Die gesamte Proteinmenge je Probe betrug zwischen 10 und 20µg. Um einen Überblick über die pH-Verteilung zu bekommen und zur genaueren Bestimmung des isoelektrischen Punktes wurde Protein-Testmischung 9 mitaufgetragen. Nach Anlegen der Elektroden und deren Beschweren mit Glasplatten wurde die Fokussierung gestartet.
Für die verwendeten Gelformate betrugen die Parameter: 5 mA, 2,25 Watt, 1,2 KVolt, Gesamtdauer 120 min.
Nach Beendigung der Fokussierung wurde das Precote für 15 min in Trichloressigsäure (20%) eingebracht, abtropfen lassen und 15-30 sec in ein Bad von Methanol-Eisessig-Wasser (40:10:50) gelegt. Das Anfärben der Precote-Schicht erfolgte mit Serva Blau G (0,08%). Entfärbt wurde wieder mit Methanol-Eisessig-Wasser und das in feuchtem Zustand berührungsempfindliche Precote im Abzug getrocknet.

5. Isolierung und Reinigung der Elongationsfaktoren EF-G und EF-Tu aus Lactobacillus casei

A. Anzucht der Bakterien

Die Vorkulturen zur Beimpfung der Fermenter wurden in 100ml Erlenmeyerkolben mit 100ml MRS-Medium angesetzt und bei 30°C über Nacht stehengelassen.
Drei Fermenter mit je 10 L Nutzinhalt (Modell F 314, New Brunswick Scientific Co., New Brunswick, N.Y., USA) wurden mit je 10 L Nährlösung gefüllt und 30 min bei 134°C im Autoklaven sterilisiert. Nach Abkühlen der Nährlösung wurden die Fermenter bei 30°C im Wasserbad temperiert und mit je 100ml der Übernachtkultur beimpft.
Das Wachstum wurde nach 9 Stunden durch Kühlen der Fermenter bzw. durch direkte Zugabe von Eis beendet und die Zellen mittels einer Durchlaufzentrifuge (Typ LWA 205, Westfalia Seperator, Oelde, Westf.) geerntet. Die Zellausbeute betrug 50g (Naßgewicht). Die Zellen wurden bei -70°C aufbewahrt.

B. Zellaufschluß

Die aufgetauten Zellen wurden durch Zerreiben (ca. 15 min) in einem vorgekühlten Porzellanmörser bei 4°C mit zwei Zellgewichten portionsweise zugesetztem Aluminiumoxid (Alcoa A 305) aufgeschlossen. Zur Elution wurden ein bis zwei Zellgewichte Standardpuffer, der 1µM GDP und zur Hemmung von Serinproteasen 10µM PMSF enthielt, langsam zugegeben.

C. Herstellung des S 30

Um Aluminiumoxid, Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen zu entfernen wurde das Homogenat einer Zentrifugation unterworfen (Sorvall Superspeed RC-B, Rotor SS 34, 13000 rpm, 20 min, 2°C). Dem Überstand wurde 2µg DNase I/ml zugesetzt und nach 10 min nochmals bei 16000 rpm zentrifugiert (S 30)!

D. Trennung von EF-G und EF-Tu aus Lactobacillus casei
Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose Cl-6B

Der S 30-Extrakt wurde auf eine Pharmacia-Säule (30 x 1,6 cm) von DEAE-Sepharose Cl-6B aufgetragen, die mit SP10/1 µM GDP/ 10 µM PMSF äquilibriert war. Anschließend wurde mit einem Säulenvolumen Äquilibrierpuffer nachgewaschen und die Elongationsfaktoren durch einen linearen Gradienten von 0,1-0,4M KCl in 400ml SP10/1 µM GDP/10 µM PMSF eluiert. Die Flußrate betrug 15ml pro Stunde. Es wurden Fraktionen à 6ml gesammelt und auf EF-G bzw. EF-Tu·GDP getestet.
Die beschriebene Ionenaustauschchromatographie sowie alle weiteren Reinigungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

E. Reinigung von EF-G und EF-Tu aus Lactobacillus casei
Hydrophobe Chromatographie an Phenyl-Sepharose Cl-4B

Die Fraktionen der DEAE-Sepharose-Elution mit EF-G bzw. EF-Tu-Aktivität wurden getrennt vereint, 2M an KCl gemacht und jeweils auf eine Phenyl-Sepharose-Säule (30 x 1,6 cm) aufgetragen, die zuvor mit SP10/1 µM GDP/10 µM PMSF/2M KCl äquilibriert worden war.
Nach Waschen mit einem Säulenvolumen Äquilibrierpuffer wurde zur Elution ein linear fallender Gradient von 1-0,03M KCl in 400ml SP10/1 µM GDP/10 µM PMSF angelegt.
Für die Reinigung von EF-G betrug die Flußrate 19ml pro Stunde; es wurden Fraktionen à 6ml gesammelt und auf EF-G getestet. Bei der EF-Tu-Reinigung wurde mit 17ml pro Stunde eluiert; die Größe der einzelnen Fraktionen, die auf EF-Tu-Aktivität getestet wurden, betrug 7ml.

F. Gelfiltration an Sephadex G 100

Die Fraktionen der Phenyl-Sepharose-Chromatographie, die EF-Tu bzw. EF-G enthielten, wurden vereint und durch Ultrafiltration (Amicon Ultrafiltrationsapparatur, Ultrafiltrationsmembran YM 10) eingeengt. Die Konzentrate wurden jeweils auf eine Säule von Sephadex G 100 (90 x 1,5 cm) aufgetragen, die mit SP10/

1 µM GDP äquilibriert war. EF-Tu und EF-G wurden mit Äquilibrierpuffer bei einer Fließgeschwindigkeit von 14 bzw. 15ml pro Stunde eluiert. Es wurden Fraktionen von 4,5ml aufgefangen und auf die entsprechenden enzymatischen Aktivitäten getestet. Die aktiven Fraktionen wurden wiederum gepoolt und durch Ultrafiltration eingeengt.

Alle Schritte der Reinigung wurden bei 4 °C durchgeführt. Die gereinigten Proteine wurden in 50% Glyzerin bei -20 °C aufbewahrt.

6. Partielle Reinigung des Elongationsfaktors EF-Ts aus Lactobacillus casei

Die Präparation von EF-Ts erfolgte in Anlehnung an das von WITTINGHOFER et al. (1983) beschriebene Verfahren.

A. Zellaufschluß und Darstellung des S 30

Eine entsprechende Menge aufgetauter Zellen wurde mit der doppelten Menge Aluminiumoxid (Alcoa A 305) für 15 min im vorgekühlten Porzellanmörser bei 4 °C aufgeschlossen und mit ein bis zwei Zellgewichten Puffer A (50mM Tris HCl pH 7,6, 10mM $MgCl_2$, 0,5mM Dithioerythritol, 10 µM PMSF) eluiert. Aluminiumoxid und Zelltrümmer wurden bei 20000 x g während 20 min in der Sorvall-Zentrifuge entfernt. Dem Überstand wurden 2 µg DNase I/ml zugesetzt und nochmals für 30 min bei 30000 x g zentrifugiert (S 30).

B. Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose Cl-6B

Der Zellextrakt wurde auf eine DEAE-Sepharose-Säule (30 x 1,6 cm) aufgetragen, die zuvor mit Puffer A äquilibriert worden war. Nach Durchwaschen mit einem Säulenvolumen Äquilibrierpuffer erfolgte die Elution von EF-Ts durch Anlegen eines linearen Gradienten von 0-0,4M NaCl in 400ml Puffer A.

Die Fließgeschwindigkeit betrug 17ml pro Stunde. Es wurden Fraktionen von 7ml gesammelt und auf EF-Tu bzw. EF-Ts getestet. Die Fraktionen mit EF-Ts-Aktivität wurden gepoolt, unter Rühren durch Zugabe von 2N Essigsäure auf pH 4,6 angesäuert, ca. eine Stunde bei 0°C stehengelassen und anschließend der Niederschlag für 10 min bei 10000 x g abzentrifugiert.

C. Ionenaustauschchromatographie an CM-Sepharose Cl-6B

Der Überstand der vorhergehenden Zentrifugation wurde auf eine mit Puffer B (100mM Natriumacetat pH 4,6, 1mM Dithioerythritol, 0,2mM EDTA) äquilibrierte CM-Sepharose-Säule (30 x 1,6 cm) aufgetragen. Nach Waschen mit einem Säulenvolumen Puffer B erfolgte die Elution der Enzymaktivität durch Anlegen eines linearen Gradienten von 0,1-0,6M KCl in 400ml Puffer B. Bei einer Flußrate von 18,5ml pro Stunde wurden Fraktionen von je 7ml aufgefangen und getestet.
Die aktiven Fraktionen wurden vereint und durch Ultrafiltration in einer Amicon-Zelle mit einer YM 10 Membran konzentriert.

D. Gelfiltration an Ultrogel AcA 44

Die vereinten und Konzentrierten Fraktionen der CM-Sepharose-Chromatographie wurden auf eine Säule (90 x 1,5 cm) mit AcA 44 aufgetragen. Als Äquilibrier- und Elutionspuffer diente hier Puffer A ohne Mg^{2+}. Die Flußrate betrug 17ml pro Stunde. Es wurden Fraktionen von 8,5ml gesammelt. Die aktiven Fraktionen wurden gepoolt, ultrafiltriert und in 50% Glyzerin bei -20°C aufbewahrt.

7. Isolierung und Reinigung der Elongationsfaktoren EF-G und EF-Tu aus Escherichia coli MRE 600

A. Anzucht von E.coli MRE 600 im 200 L-Maßstab

Das Impfmaterial wurde über Nacht in jeweils 500ml Nährlösung in 2 L Erlenmeyerkolben mit seitlichem Einstich auf einer rotierenden Schüttelmaschine (120Upm) bei 37°C hergestellt.

Die Anzucht von E.coli MRE 600 erfolgte in einem Fermenter mit 200 L Nutzinhalt (b200, AG für biologische Verfahrenstechnik, Basel, Schweiz), der zu diesem Zweck mit 2 L der Vorkultur versetzt wurde. Nach drei Stunden Wachstum bei 37°C unter Belüftung mit 3000 L steriler Luft pro Stunde im Umwurfsystem bei 800Upm wurde die Fermentation bei einer OD_{578nm} von 1,4 durch Abkühlen auf 10°C beendet. Das Zellmaterial wurde mittels einer Durchlaufzentrifuge (10000Upm; Durchfluß 1 L/min) geerntet und bei -70°C aufbewahrt. Die Zellausbeute betrug 300g (Naßgewicht).

B. Zellaufschluß

50g angetaute Zellen wurden in 100ml SP10/1µM GDP/10µM PMSF suspendiert und 25mg Lysozym zugegeben. Der Ansatz wurde für 5 min bei Raumtemperatur belassen, ehe 2,5ml einer Natriumdesoxycholat-Lösung (4%) und 1mg DNase I zugesetzt wurden. Die Suspension wurde gut durchgerührt und für weitere 20 min bei Raumtemperatur stehengelassen.

C. Darstellung des S 30 und weitere Reinigung der Elongationsfaktoren EF-G und EF-Tu aus E.coli MRE 600

Die Herstellung des S 30 und die anschließende Reinigung der Elongationsfaktoren erfolgte wie unter II.5 beschrieben durch aufeinanderfolgende Chromatographie an DEAE-Sepharose Cl-6B, Phenyl-Sepharose Cl-4B und Sephadex G 100.

8. Präparation von 70S Ribosomen aus Escherichia coli MRE 600 und Lactobacillus casei

Gleiche Zellmengen wurden nach den unter II.5 bzw. II.7 angegebenen Verfahren aufgeschlossen und durch Zentrifugation in der Sorvall-Zentrifuge (Rotor SS 34, 20 min) ein S 30-Extrakt gewonnen. Dieser wurde in einer Beckman Ultrazentrifuge (Typ L5-50, Rotor 60 Ti) bei 4°C und 113000 x g für drei Stunden zentrifugiert um die Ribosomen zu pelletieren. Der Überstand

(S 100) wurde dekantiert und konnte für andere präparative Zwecke verwendet werden. Die Ribosomen-Pellets wurden in Standardpuffer aufgenommen und durch leichtes Schütteln resuspendiert. Die Ribosomen wurden anschließend durch ein Saccharosekissen (SP10/500mM NH_4Cl/1,1M Saccharose) zentrifugiert (Ultrazentrifuge L5-50, Rotor 60 Ti, 100000 x g, 17 h). Die Ribosomen wurden in geringer Menge Standardpuffer aufgenommen, mit derselben Menge an Glyzerin versetzt und bei -20 C aufbewahrt.
Die Konzentration der Ribosomen-Lösung wurde durch Messung der Absorption bei 260nm bestimmt (A_{260}-Einheiten/ml). Desweiteren wurde die für E.coli Ribosomen bestimmte Umrechnung verwendet (eine A_{260}-Einheit entspricht 25pMol 70S Ribosomen). Die funktionelle Intaktheit der Ribosomen wurde im *in vitro*-Translationssystem geprüft.

9. Essigsäure-Extraktion der ribosomalen Proteine

Die Extraktion der ribosomalen 70S-Proteine erfolgte nach der Methode von HARDY et al. (1969), die eine Modifikation der ursprünglich von WALLER und HARRIS (1961) beschriebenen Anleitung darstellt.
Je 2000 A_{260}-Einheiten an 70S Ribosomen aus E.coli bzw. L.casei wurden mit 0,1 Volumen $MgCl_2$ (1M) und 2 Volumen Eisessig versetzt und bei 4 C ca. 45 min lang gerührt.
Die ausgefallene rRNA wurde für 10 min bei 20000 x g in der Sorvall-Zentrifuge (Rotor SS 34, 4 C) abzentrifugiert, der Niederschlag mit derselben Eisessig-Mischung nochmals extrahiert und wieder zentrifugiert. Die Überstände der beiden Zentrifugationsschritte wurden vereint und die essigsäurelöslichen ribosomale Proteine über Nacht mit 10 Volumen Aceton bei -20 C gefällt. Die ausgefällten Proteine wurden abzentrifugiert (Rotor SS 34, 20000 x g, 20 min) und anschließend lyophilisiert.

10. Darstellung von Phe-tRNA bzw. [^{14}C]-Phe-tRNA

Die Präparation von mit Phenylalanin beladener tRNA basiert

auf der von VOORMA et al. (1971) beschriebenen Methode. Hierbei wird tRNA aus E.coli MRE 600 mit einem S 100, ATP und [^{14}C]-Phenylalanin bzw. unmarkiertem Phenylalanin bei 30 C inkubiert. Die beladene tRNA wird durch Phenolextraktion von freiem Phenylalanin und den Proteinen des S 100 getrennt und zusätzlich durch Gelfiltration an Sephadex G 25 gereinigt.

11. Reinigung der Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus Escherichia coli MRE 600

Die Präparation der Phe-tRNA-Synthetase aus E.coli MRE 600 erfolgte in Anlehnung an STULBERG (1967).
Der nach Zellaufschluß und aufeinanderfolgende Zentrifugation erhaltene S 100 Extrakt wurde auf eine DEAE-Sepharose Cl-6B enthaltende Chromatographie-Säule aufgetragen und durch einen Salzgradienten (O-O,2M KCl) in Standardpuffer eluiert.
Die aktiven Fraktionen wurden vereint und durch Ultrafiltration (Membran PM 30) eingeengt bevor sie durch Gelfiltration an Sephacryl S 200 (SP10/100mM KCl) weiter gereinigt wurden. Die nach der Gelfiltration aufgefangenen Fraktionen mit Phe-tRNA-Synthetase-Aktivität wurden wiederum vereint und durch Ultrafiltration konzentriert.Die Lösung der Phe-tRNA-Synthetase wurde mit gleicher Menge Glyzerin versetzt und bei -20°C aufbewahrt.

12. Testsysteme zum Nachweis und zur Charakterisierung von EF-G und EF-Tu aus E.coli MRE 600 und L.casei

A. Verdünnungsreihentest

Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration der, in der Elongationsphase der Proteinbiosynthese angreifenden, Hemmstoffe wurde der Verdünnungsreihentest nach KAVANAGH (1963) verwendet. Mehrere Verdünnungen des Antibiotikums wurden in Glasgefäßen mit dem zu testenden Organismus inkubiert und die niedrigste Hemmstoffkonzentration, die gerade eine vollstän-

dige Wachstumshemmung verursacht, als minimale Hemmkonzentration bestimmt.
Die Angabe der Minimale Hemmkonzentration erfolgte in µg/ml.

B. Bindung von [^{3}H]-GDP an EF-Tu

MILLER und WEISSBACH (1974) beschreiben den Nachweis von EF-Tu durch Bindung von [^{3}H]-GDP und Adsorption des entstandenen EF-Tu·[^{3}H]-GDP-Komplexes an Nitrocellulose-Filter. Freies GDP kann das Filter passieren und wird ausgewaschen.

Durchführung:	[^{3}H]-GDP-Mix	10ml SP10/1µM GDP
		10µl [^{3}H]-GDP (14,4Ci/mMol)
	Testansatz	50µl zu testende Probe
		100µl [^{3}H]-GDP-Mix

Die im Testansatz enthaltenen 100pMol [^{3}H]-GDP werden mit einer Probe entsprechender EF-Tu-Aktivität für 10 min bei 30°C inkubiert. Ein Aliquot von 140µl wurde anschließend in 2ml kalten Waschpuffer pipettiert, durch Zellulosenitrat-Filter gesaugt und fünfmal mit je 2ml Waschpuffer gewaschen. Die Nitrocellulose-Filter wurden unter einer Rotlichtlampe (150 Watt) getrocknet und die auf dem Filter verbliebene Radioaktivität wie unter II.4.C beschrieben bestimmt.
Aufgrund des molaren 1:1-Verhältnisses der Bindung von EF-Tu und GDP entspricht 1pMol auf dem Filter verbliebenes [^{3}H]-GDP gerade 1pMol EF-Tu.
1 Unit EF-Tu entspricht der Menge Protein, die unter den angegebenen Bedingungen 1pMol GDP bindet.

C. EF-Ts-katalysierter Austausch von GDP

Zum Nachweis von EF-Ts macht man sich dessen Fähigkeit zunutze, den Austausch von freiem und EF-Tu-gebundenem GDP zu katalysieren. Bei einer Temperatur von 0°C findet ohne EF-Ts innerhalb von 5 min kein merklicher Austausch des Guaninnukleotids statt. In Anwesenheit von EF-Ts jedoch erreicht der GDP-Austausch (5 min, 0°C) die Werte der bei 30°C in 10 min durchgeführten GDP-Bindung.

D. Poly(U)-abhängige Poly(Phe)-Synthese

Die zellfreie Poly(U)-codierte Poly(Phe)-Synthese kann als Modellreaktion der Elongationsphase der Proteinbiosynthese angesehen werden. Bei hohen Mg^{2+}-Konzentrationen erfolgt die Initiation unspezifisch und auch die Termination wird in diesem Testsystem nicht erfaßt.
[^{14}C]-Phenylalanin wird in Trichloressigsäure-unlösliches Poly(Phe) eingebaut, das nach Adsorption an Papierfilter durch Radioaktivitätsmessung nachgewiesen werden kann. Durch Erhitzen wird [^{14}C]-Phe-tRNA hydrolysiert und zusammen mit freiem [^{14}C]-Phe ausgewaschen (PARMEGGIANI et al.,1971).

Durchführung: in 90µl Standardpuffer waren enthalten: 100nMol ATP, 100nMol GTP, 100nMol Phospho*enol*-pyruvat, 60µg tRNA aus E.coli MRE 600, 2µg Phe-tRNA-Synthetase aus E.coli MRE 600, 2µg Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel, ca. 200pMol EF-Tu und 50pMol EF-G aus den beiden Testorganismen, 100pMol [^{14}C]-Phe (522mCi/mMol).

Der Ansatz wurde 10 min bei 30°C vorinkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 25pMol Ribosomen (1 A_{260}-Einheit) und 4µg Poly(U) in 10µl Standardpuffer gestartet und weitere 10 min bei 30°C belassen. Ein Aliquot von 90µl wurde auf Papierfilter (Whatman 3MM, ø 25mm) pipettiert und in einen Teflon-Filterkorb (nach Matthaei, Schleicher und Schüll, Dassel) transferiert. Kalte TCA (10%) wurde zugegeben und zur Hydrolyse von [^{14}C]-Phe-tRNA ca. 15 min auf 95°C erhitzt. Die Filter wurden danach mit TCA (5%, zweimal je 10 min), Ether/Ethanol (1:1, 5 min) und Ether (5 min) gewaschen und unter einer Rotlichtlampe getrocknet. Die auf dem Filter verbliebene Radioaktivität wurde nach Abschnitt II.4.C bestimmt.
Um den Einfluß von Antibiotika auf die *in vitro*-Proteinbiosynthese zu untersuchen, wurden diese in 10µl Standardpuffer zu Beginn der Vorinkubation eingesetzt. Falls es die Löslichkeitseigenschaften erforderlich machten, erfolgte die Zugabe der Antibiotika in 10µl methanolischem Standardpuffer (Endkonzentration im Test 1-2% Methanol).

Je nach Angriffsort der verwendeten Antibiotika wurden adequate Mengen EF-G, EF-Tu oder Ribosomen aus E.coli MRE 600 bzw. L.casei im Test eingesetzt.
Antibiotika, die am Ribosom angreifen, wurden mit Poly(U) und Ribosomen vorinkubiert (10 min), bevor der restliche Ansatz zugegeben wurde.

E. EF-G-abhängige GTP-Hydrolyse

Der Ansatz zum Nachweis der entkoppelten EF-G-abhängigen GTP-Hydrolyse in Abwesenheit von Poly(U) und tRNA bzw. Phe-tRNA enthielt in einem Volumen von 75µl: 6µMol Tris HCl pH 7,8, 1µMol $MgCl_2$, 4,5µMol NH_4Cl, 400nMol Mercaptoethanol, 12,5pMol Ribosomen aus E.coli MRE 600, 1-2µg EF-G aus E.coli MRE 600 bzw. L.casei und variable Mengen Fusidinsäure.
Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5nMol GTP und 25nCi γ-$[^{32}P]$-GTP in 15µl Standardpuffer gestartet und der Reaktionsansatz 15 min lang bei 30°C belassen. Nach Ablauf dieser Zeit wurden 75µl einer Lösung zugegeben, die 1M an $HClO_4$ und 10mM an KH_2PO_4 war, um die GTP-Hydrolyse zu beenden. In der Eppendorf-Zentrifuge wurde 5 min abzentrifugiert und 100µl des klaren Überstandes abpipettiert. Dieses Aliquot wurde mit 400µl Isopropanolacetat und 300µl Natriummolybdat (20mM) versetzt und zur Extraktion des entstandenen Phosphomolybdato-Komplexes mehrere Male für je 10 sec am Schüttler gemischt.
Zur Phasentrennung wurde kurz abzentrifugiert, 150µl der organischen Oberphase abgenommen, auf 3MM-Filter gegeben, unter der Rotlichtlampe getrocknet und die auf dem Filter befindliche Radioaktivität in einem Flüssigszintillationsspektrometer (LS 6800, Beckman) bestimmt.

Zusätzlich zur entkoppelten GTPase-Reaktion enthielt der Ansatz zum Nachweis der gekoppelten EF-G-abhängigen GTP-Hydrolyse pro Test 5µg Poly(U), 10 A_{260}-Einheiten tRNA aus E.coli MRE 600 und 35pMol Phe-tRNA.
Gestartet wurde die Reaktion wiederum durch Zusatz von GTP und γ-$[^{32}P]$-GTP. Nach Inkubation bei 30°C wurde desweiteren wie oben beschrieben verfahren.

F. Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekulargewichte der Elongationsfaktoren bzw. ihrer Bruchstücke nach tryptischem Verdau wurden durch SDS-Poly-Acrylamid-Gelelektrophorese gemäß II.4.D bestimmt.
Aus den relativen Beweglichkeiten (Laufstrecke des jeweiligen Proteins dividiert durch die Gesamtlaufstrecke) und dem Logarithmus des Molekulargewichts der mitgeführten Eichproteine wurde eine Eichkurve erstellt (WEBER und OSBORN, 1969).

G. Tryptische Proteolyse von EF-G

Äquivalente Mengen an EF-G aus E.coli MRE 600 bzw. L.casei (je 115µg) wurden bei 30°C einem tryptischen Verdau mit TPCK-behandeltem Trypsin (230 U/mg; 91% Protein) in Standardpuffer unterworfen. Die Trypsinmenge im Ansatz betrug 1% der eingesetzten Menge an EF-G.
Nach festgelegten Zeitpunkten wurde ein Aliquot entnommen und die Proteolyse durch Zugabe von Trypsininhibitor (aus Sojabohnen; vierfache Menge bezogen auf Trypsin) beendet. Mit den so behandelten Proben wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach II.4.D durchgeführt.

Zum Nachweis einer möglichen Wechselwirkung zwischen EF-G und deacylierter tRNA enthielt der Ansatz zu Beginn der Inkubation neben dem Elongationsfaktor einen ca. 20fachen Überschuß an tRNA aus E.coli MRE 600 (bezogen auf die eingesetzte Menge an EF-G). Der tryptische Verdau und die weitere Behandlung der Proben erfolgte analog.

H. Thermische Stabilität von EF-G

Hitzestabilität der Poly(Phe)-Aktivität: ausreichende Mengen an EF-G aus E.coli MRE 600 und L.casei wurden 5 min lang in Standardpuffer bei festgelegten Temperaturen zwischen 30°C und 80°C inkubiert, auf Eis gestellt und anschließend für eine Poly(U)-codierte Poly(Phe)-Synthese gemäß II.12.D verwendet.

Hitzestabilität der GTPase-Aktivität: entsprechende Mengen von EF-G aus beiden Testorganismen wurden in Standardpuffer für 5 min bei Temperaturen zwischen 30°C und 80°C belassen, auf Eis gestellt und einer entkoppelten EF-G-abhängigen GTP-Hydrolyse nach II.12.E unterzogen.

I. Einfluß von SH-Gruppenreagenzien auf EF-G

Um den Einfluß von N-Ethylmaleimid (NEM) auf EF-G zu untersuchen, wurde wie bei MILLER (1971) verfahren.
6µg EF-G aus E.coli MRE 600 bzw. 2,4µg EF-G aus L.casei wurden mit 2mM sowie 4mM NEM in 100µl mercaptoethanolfreiem Standardpuffer bei 30°C inkubiert.
Nach festgelegten Zeitpunkten wurden je 15µl entnommen, zu einem ca. sechsfachen Überschuß an Mercaptoethanol in 35µl Standardpuffer pipettiert und auf Eis gestellt. Mit den derart vorbehandelten Proben wurde eine *in vitro*-Translation nach II.12.D durchgeführt, um die verbliebene Aktivität zu bestimmen. Der Kontrollansatz ohne NEM wurde analog behandelt.

K. Hemmung der Bindung des ternären Komplexes EF-Tu·GTP·AA-tRNA an 70S Ribosomen durch Fusidinsäure

Im Reaktionsansatz waren in 72,5µl Standardpuffer enthalten: 50pMol Ribosomen aus E.coli MRE 600, 10µg Poly(U), 50µg tRNA aus E.coli MRE 600, 10nMol GTP, 10µg Pyruvatkinase, 200nMol Phospho*enol*pyruvat, 1µg EF-G aus beiden Testorganismen und variable Mengen Fusidinsäure.
Nach Inkubation bei 30°C für 5 min wurden 20pMol EF-Tu aus E.coli MRE 600 zugegeben und nochmals für 5 min bei 30°C belassen. Anschließend wurde mit 17,5pMol [^{14}C]-Phe-tRNA in 25µl Standardpuffer auf ein Endvolumen von 100µl ergänzt und der vollständige Testansatz 15 min lang bei 30°C inkubiert.
Ein Aliquot von 90µl wurde auf Nitrocellulose-Filter pipettiert, abgesaugt, fünfmal mit Waschpuffer gewaschen, die Filter unter Rotlicht getrocknet und die Radioaktivität gemäß II.4.C bestimmt.

L. Hemmung der Poly(Phe)-Synthese mit EF-G aus E.coli MRE 600 durch Fusidinsäure;Titration mit EF-G aus L.casei

In 80-90µl Reaktionsmix waren enthalten: 100nMol GTP, 100nMol ATP, 100nMol Phospho*enol*pyruvat, 2µg Phe-tRNA-Synthetase aus E.coli MRE 600, 2µg Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel, ca. 200pMol EF-Tu aus E.coli MRE 600, 24pMol EF-G aus E.coli MRE 600, 10nMol Fusidinsäure und 100pMol [^{14}C]-Phenylalanin (522mCi/mMol).
Der Ansatz wurde 10 min bei 30°C vorinkubiert, die *in vitro*-Translation anschließend durch Zugabe von 12pMol Ribosomen aus E.coli MRE 600 und 2µg Poly(U) in 10µl Standardpuffer gestartet und weitere 10 min bei 30°C inkubiert. Danach wurde mit steigenden Mengen an EF-G aus L.casei (4-22pMol) zu einem Endvolumen von 100µl aufgefüllt und nochmals für 10 min bei 30°C belassen.Ein Aliquot von 90µl wurde entnommen,auf Papier-Filter pipettiert und zur Quantifizierung des in TCA-unlösliches Polypeptid eingebautem [^{14}C]-Phe wie in Abschnitt II.12.D weiterverfahren.

M. Beladungstest auf tRNA

Der Nachweis von deacylierter tRNA erfolgte durch enzymatische Beladung mit [^{14}C]-Phe und Adsorption der entstandenen [^{14}C]-Phe-tRNA an 3MM-Filter. Freies [^{14}C]-Phe wird durch mehrere Waschschritte in einem Teflon-Filterkorb entfernt.

Durchführung: 100nMol ATP, 2µg Phe-tRNA-Synthetase aus E.coli MRE 600 und 100pMol [^{14}C]-Phe in 20µl Standardpuffer wurden mit 100µl Probe versetzt und 10 min bei 30°C inkubiert. Von diesem Ansatz wurden 100µl auf Papierfilter pipettiert,unter der Rotlichtlampe kurz getrocknet und in einen Teflon-Filterkorb überführt. Mit eiskalter TCA (10%) wurde 10 min lang gewaschen, im Unterschied zur Poly(Phe)-Synthese jedoch nicht erhitzt. Im weiteren wurde wie in II.12.D verfahren.

N. Test auf eine mögliche Wechselwirkung von EF-G und deacylierter tRNA durch Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation

Mit Hilfe eines Gradientenmischers wurden in Cellulose-Zentrifugenröhrchen (Kontron, 4,4ml, 11x60mm) Dichtegradienten von 7-15% Sucrose in SP10/1µM GDP hergestellt. Die Röhrchen wurden mehrere Stunden bei 4°C belassen, damit sich der Dichtegradient voll ausbilden kann.
Die Gradienten wurden mit ca. 20µg EF-G aus L.casei, ca. 300µg tRNA aus E.coli MRE 600 bzw. einem EF-G/tRNA-Gemisch beladen. Anschließend wurde in einer Ultrazentrifuge (Beckman, L5-50, Rotor SW 60Ti) bei 4°C 16 Stunden lang bei 45000Upm zentrifugiert. Die Zentrifugenröhrchen wurden am Boden angestochen, der Sucrose-Gradient fraktioniert und die einzelnen Fraktionen auf EF-G bzw. tRNA getestet.
Zum Nachweis von EF-G diente die Komplettierung der Poly(Phe)-Synthese gemäß II.12.D. Deacylierte tRNA wurde durch enzymatische Beladung mit $[^{14}C]$-Phe und Adsorption der $[^{14}C]$-Phe-tRNA auf Papierfilter nachgewiesen (II.12.M).

III. E R G E B N I S S E

1. Zweidimensionale Gelelektrophorese von 70S Proteinen

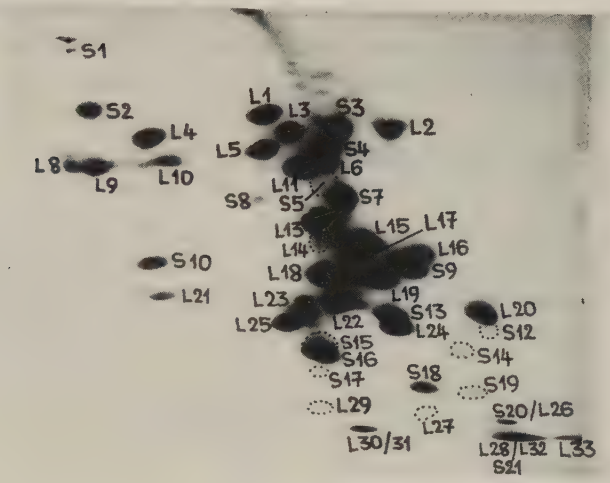


Abb.3: Proteinmuster der 70S Ribosomen aus Escherichia coli

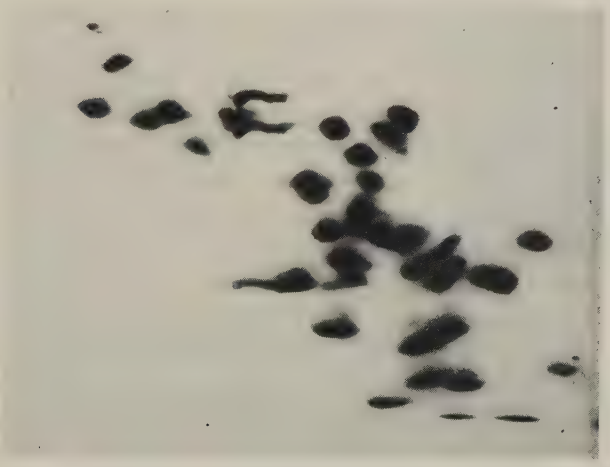


Abb.4: Proteinmuster der 70S Ribosomen aus Lactobacillus casei

Die Präparation der Ribosomen, die Extraktion der ribosomalen Proteine und die Durchführung der zweidimensionalen Gelelektrophorese erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben. Die vorhergehenden Abbildungen zeigen das ribosomale Proteinmuster von E.coli (Abb.3) und L.casei (Abb.4). Für E.coli ist die übliche Nomenklatur der ribosomalen Proteine angegeben. (WITTMANN,1974). Die Proteinmuster der beiden Testorganismen weisen erhebliche Unterschiede auf.

2. Gradientengelelektrophorese von ribosomaler RNA

E.coli und L.casei zeigten bei der gelelektrophoretischen Analyse ihrer rRNA keine Unterschiede (Abb.5). Frisch präparierte Ribosomen aus beiden Testorganismen zeigen deutlich die beiden Banden der 23S rRNA und der 16S rRNA. Schwächer zu erkennen ist im unteren Bereich des Gels die 5S rRNA. Als Vergleich wurde ein tRNA-Gemisch aus E.coli MRE 600 mitaufgetragen.

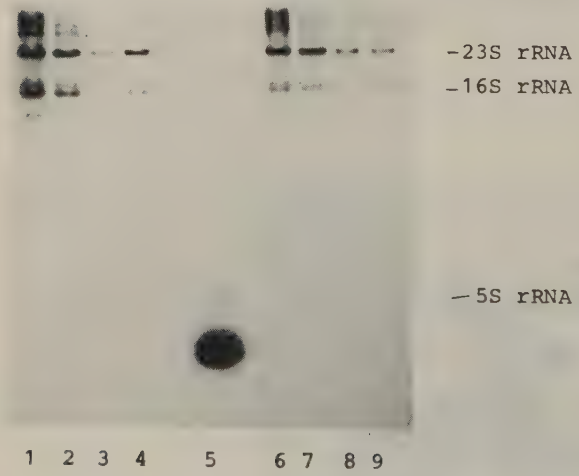


Abb.5: Gelelektrophoretische Analyse der ribosomalen RNA aus E.coli und L.casei
(1-4): rRNA aus E.coli MRE 600; (5): tRNA aus E.coli MRE 600; (6-9): rRNA aus L.casei; für die Proben 3, 4, 8 und 9 wurden jeweils frisch präparierte Ribosomen aus beiden Testorganismen verwendet.

3. Reinigung der Elongationsfaktoren EF-G und EF-Tu aus Lactobacillus casei

Die Reinigung beider Elongationsfaktoren umfaßte in der angegebenen Reihenfolge die Teilschritte Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose Cl-6B, hydrophobe Chromatographie an Phenyl-Sepharose Cl-4B und Gelfiltration an Sephadex G 100. EF-Tu wurde während der Reinigung durch Bindung von $[^3H]$-GDP nach der Nitrocellulosefilter-Methode (II.12.B) bestimmt; ein Unit (U) entspricht dabei derjenigen Proteinmenge, die unter den beschriebenen Bedingungen ein pMol GDP bindet.
EF-G wurde durch Komplettierung der Poly(U)-abhängigen Poly(Phe)-Synthese nachgewiesen. Aufgrund der Komplexität dieses Testsystems ist eine Quantifizierung von EF-G nur näherungsweise möglich.
Der Verlauf von Ionenstärkegradienten wurde durch Messung der Leitfähigkeit ermittelt (II.4.B). Die Proteinbestimmung erfolgte nach LOWRY et al. (II.4.A). Die einzelnen Reinigungsschritte wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert (II.4.D).

50g tiefgefrorene Zellen wurden im Porzellanmörser durch Zerreiben mit Aluminiumoxid aufgeschlossen und mit 60ml SP10/1µM GDP/10µM PMSF unter Zusatz von DNase I eluiert. Die Herstellung des S 30 erfolgte wie unter II.5.C beschrieben und ergab ein Volumen von 56ml. Beide Elongationsfaktoren sollten durch die nachfolgende Ionenaustauschchromatographie nach Möglichkeit voneinander getrennt werden. Die an das Gelmaterial gebundenen Aktivitäten wurden mit einem linear steigenden Salzgradienten von 0,1-0,4M KCl in Form zweier überlappender Peaks eluiert. Die Fraktionen 9-14 wurden zur weiteren Reinigung von EF-Tu zum DEAE-Pool I vereint; die Fraktionen mit EF-G-Aktivität (15-19) ergaben den DEAE-Pool II.
Der Verlauf der enzymatischen Aktivitäten, der Proteinkonzentration und des Ionenstärkegradienten ist in Abb.6 dargestellt.

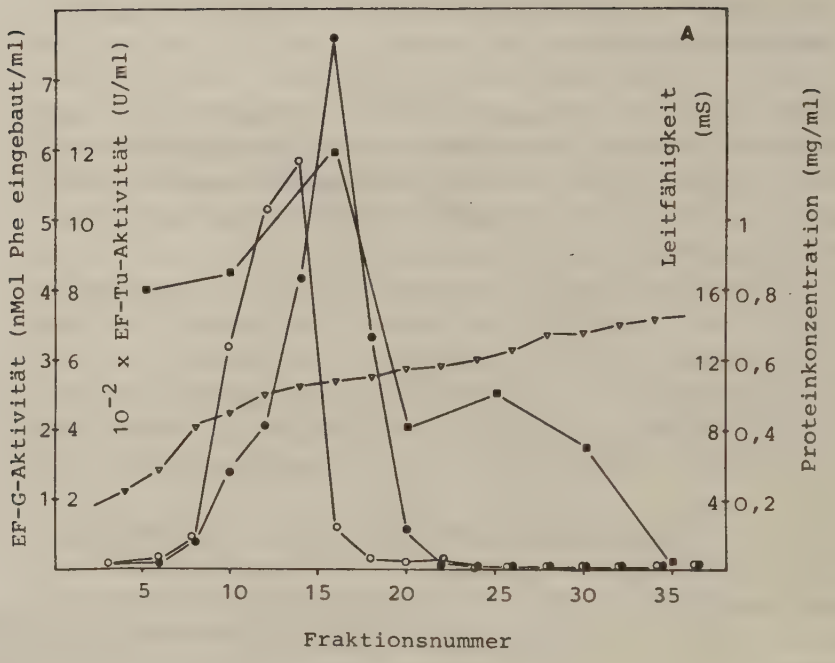


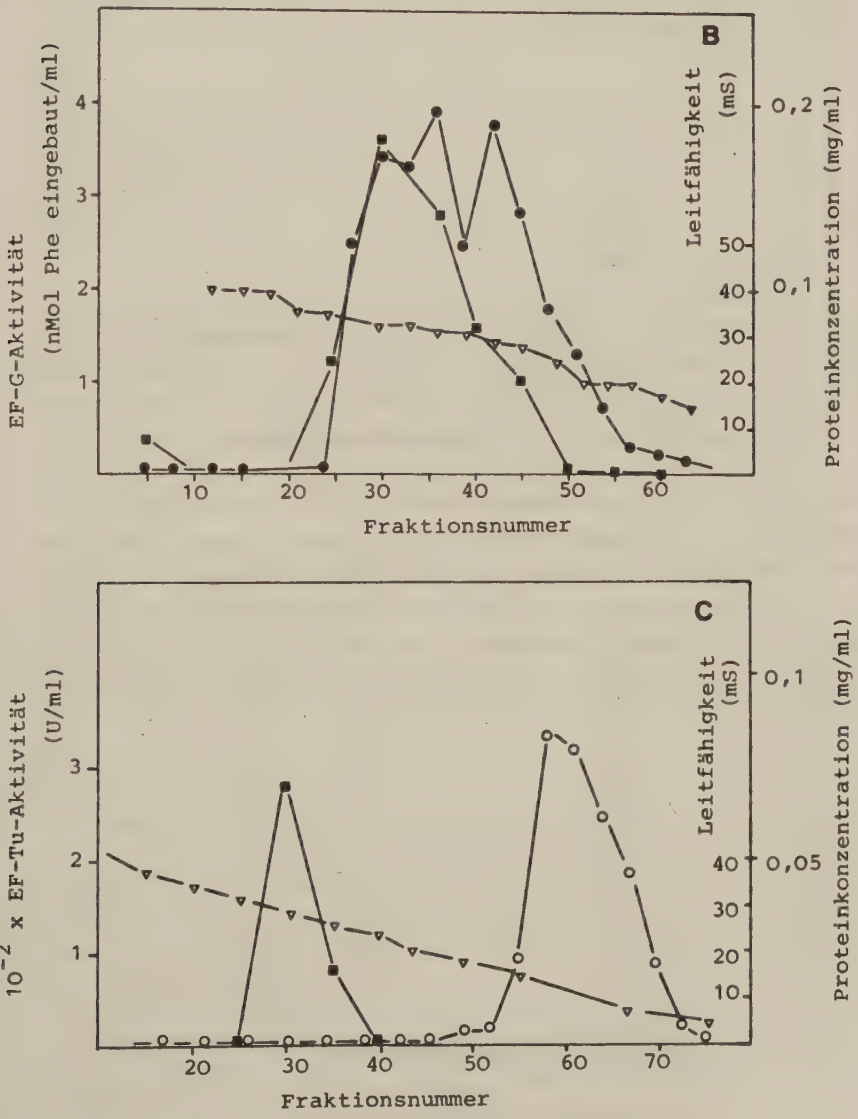
Abb. 6: Reinigung der Elongationsfaktoren aus Lactobacillus casei

(A): DEAE-Sepharose-Chromatographie eines S 30 - Extraktes aus L.casei, (B): Phenyl-Sepharose-Chromatographie von EF-G, (C): Phenyl-Sepharose-Chromatographie von EF-Tu·GDP, (D): Sephadex G 100-Gelfiltration von EF-G, (E): Sephadex G 100-Gelfiltration von EF-Tu·GDP.

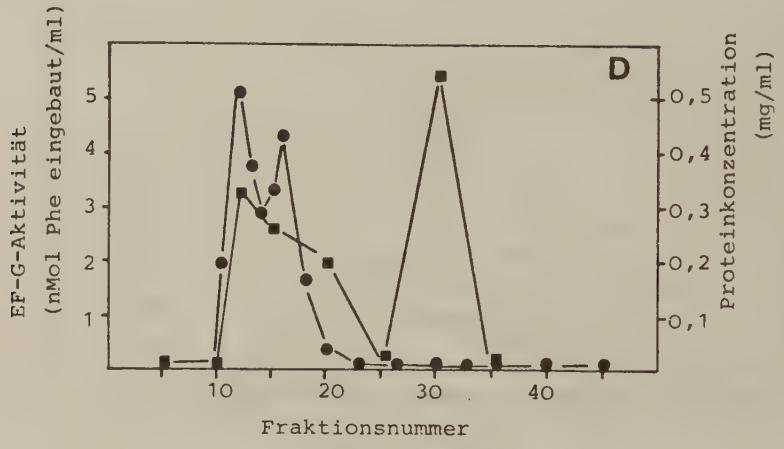
Symbole: EF-G (●), EF-Tu·GDP (○), Protein (■), Leitfähigkeit (▽)

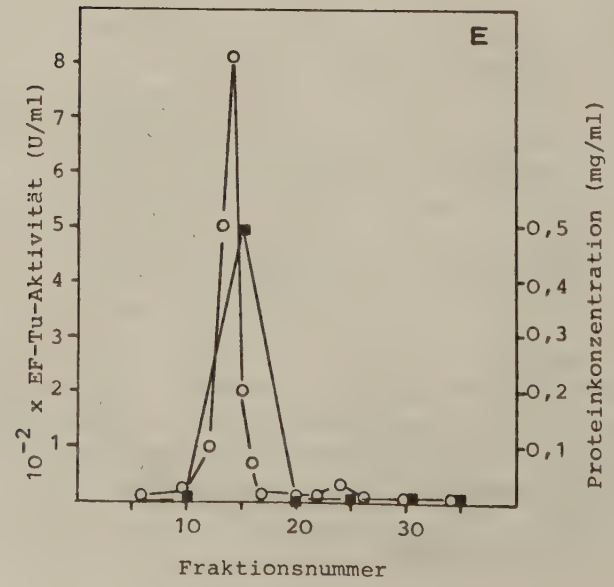
Beide DEAE-Pools wurden nach Zugabe von KCl (Endkonzentration 2M) jeweils getrennt auf eine Phenyl-Sepharose-Säule aufgetragen, die mit SP10/1µM GDP/10µM PMSF/2M KCl äquilibriert war. Die Elution erfolgte durch einen absteigenden Salzgradienten; die Fraktionen 27-45 der EF-G-Präparation wurden vereint und durch Ultrafiltration auf ein Volumen von 2,3ml eingeengt.

Der abschließende Reinigungsschritt durch Gelfiltration ergab für EF-G das in Abb.6B dargestellte Elutionsprofil. Die Fraktionen 12-16 wurden vereint, auf ein Volumen von 1,5ml eingeengt, mit demselben Volumen Glyzerin versetzt und bei -20°C aufbewahrt.



Für die Reinigung von EF-Tu wurden die Fraktionen 56-66 der Phenyl-Sepharose-Chromatographie vereint, auf ein Volumen von 2ml konzentriert und weiter an Sephadex G 100 gereinigt. Die Fraktionen 13 und 14 mit EF-Tu-Aktivität wurden gepoolt. Nach Ultrafiltration und Zugabe eines äquivalenten Volumens Glyzerin ergab sich ein Endvolumen von 1ml. Der gereinigte EF-Tu wurde ebenfalls bei -20°C aufbewahrt.





Die Ergebnisse der einzelnen Reinigungsschritte für EF-Tu·GDP sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle 1

Zusammenfassung der Reinigung von EF-Tu·GDP aus L.casei

Reinigungs-stufe	Volumen (ml)	Protein (mg)	spez.Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)
S 30	56	666	2,52	- †
DEAE-Sepharose	40	36	3844	100
Phenyl-Sepharose	66	4	5033	14
Sephadex G 100	1	1,25	13191	12

† durch die zahlreichen Komponenten des S 30 Zellextraktes wird das Testsystem nachhaltig gestört. Aus diesem Grund konnten keine verläßlichen Werte für die GDP-Bindung ermittelt werden. Stattdessen wurde die Ausbeute nach der DEAE-Sepharose-Chromatographie gleich 100% gesetzt.

Die Poly(U)-abhängige Poly(Phe)-Synthese kann nur näherungsweise zur Quantifizierung von EF-G herangezogen werden. Die Angabe der Menge Phenylalanin, die während der *in vitro*-Translation in säureunlösliches Material eingebaut wird, gibt die Aktivität von EF-G jedoch nur beschränkt wieder. Das Erstellen einer vollständigen Reinigungstabelle erschien aus diesem Grund nicht sinnvoll.

Tabelle 2

Zusammenfassung der Reinigung von EF-G aus L.casei

Reinigungs-stufe	Volumen (ml)	nMol Phe eingebaut/mg Protein
S 30	56	0,15
DEAE-Sepharose	36	2,38
Phenyl-Sepharose	95	34,8
Sephadex G 100	3	134

Abb.7: Gelelektrophoretische Analyse (10% Acrylamid) der einzelnen Reinigungsstufen der Elongationsfaktoren aus L.casei

(a): Eichproteine; (b): S 30 Extrakt; (c): DEAE-Pool EF-G; (e): EF-G nach Gelfiltration; (f): DEAE-Pool EF-Tu·GDP; (g): Phenyl-Pool EF-Tu·GDP; (h): EF-Tu·GDP nach Gelfiltration.

4. Strukturelle Charakterisierung der Elongationsfaktoren

A. Molekulargewichtsbestimmung

Zur Ermittlung ihrer Molekulargewichte wurden die gereinigten Elongationsfaktoren aus L.casei einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (10% Acrylamid) unterzogen (II.4.D).
Das Molekulargewicht wurde hierbei durch Vergleich der relativen Beweglichkeiten mitgeführter Eichproteine bekannten Molekulargewichts mit den relativen Beweglichkeiten der Elongationsfaktoren aus L.casei ermittelt. Die relative Beweglichkeit der Eichproteine wurde in einer Eichkurve gegen den Logarithmus ihrer Molekulargewichte aufgetragen.
Die partielle Reinigung von EF-Ts erfolgte nach II.6. Auf eine umfassendere Darstellung der einzelnen Reinigungsschritte wurde verzichtet. Alle Elongationsfaktoren aus L.casei zeigen ein deutlich höheres Molekulargewicht als die entsprechenden Faktoren aus E.coli (siehe Abb. 7 und 8 sowie Tabelle 3).

Tabelle 3: Molekulargewichte der Elongationsfaktoren aus E.coli und L.casei

	EF-G	EF-Tu	EF-Ts
E.coli	80000	43225	31000
L.casei	92000	52000	35000

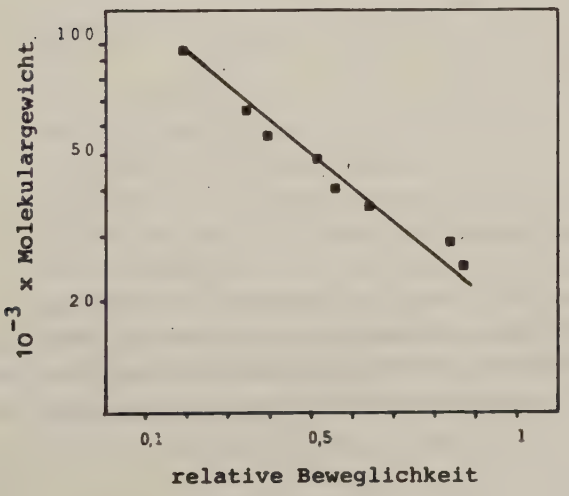


Abb.8: Eichkurve zur Bestimmung des Molekulargewichts der Elongationsfaktoren

B. Bestimmung des isoelektrischen Punktes von EF-G

Zur Ermittlung des isoelektrischen Punktes (IP) wurde eine isoelektrische Fokussierung mit Servalyt-Precotes pH 4-7 gemäß II.4.G durchgeführt. Um eine Eichgerade zu erstellen, wurden die folgenden Proteine (IP) des aufgetragenen Protein-Testgemisches herangezogen: Ferritin (4,4), Rinderserumalbumin (4,7), β-Lactoglobulin (5,34), Conalbumin (5,5), Myoglobin v. Pferd (7,3).
Der isoelektrische Punkt des Elongationsfaktors G aus E.coli wurde mit 5,5 bestimmt. Für den EF-G aus L.casei ergab sich ein Wert von 4,7.

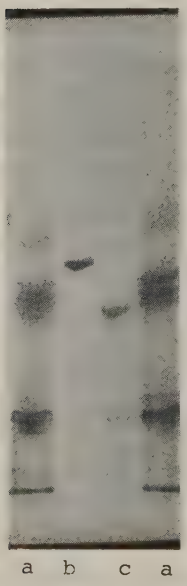


Abb.9: Isoelektrische Fokussierung von EF-G
(a): Eichmix; (b): EF-G aus L.casei; (c): EF-G aus E.coli

C. Tryptische Hydrolyse von EF-G

Das Spaltmuster und der kinetische Verlauf einer milden tryptischen Proteolyse kann vielfach als strukturelles Merkmal von Proteinen betrachtet werden, insbesondere wenn über deren Primärstruktur bislang wenig bekannt ist. So liegen mehrere

Arbeiten über die Trypsinolyse von EF-G aus E.coli bzw. EF-2 vor (SKAR et al.,1975; ALAKHOV et al.,1979; NILSSON et al., 1985). Die Proteolyse des Elongationsfaktors G aus E.coli und L.casei erfolgte nach Abschnitt II.12.G. Die auftretenden Bruchstücke und der zeitliche Verlauf der Spaltung wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verfolgt. Die angegebenen Molekulargewichte der Elongationsfaktoren und ihrer Spaltprodukte wurden anhand der relativen Beweglichkeiten der mitgeführten Eichproteine ermittelt.

- EF-G aus Escherichia coli MRE 600 (Abb.10)

  Schon nach zweiminütiger Trypsinolyse ist der EF-G aus E.coli (80000) völlig abgebaut. Die Verunreinigung des Elongationsfaktors scheint ein bei der Präparation entstandenes Bruchstück zu sein (74000), da dessen Menge im Verlauf der Trypsinspaltung zunächst zunimmt. Gleichzeitig entstehen Spaltprodukte mit den ermittelten Molekulargewichten 68000, 67000, 56000 und 51000. Die zwischenzeitlich gebildeten Fragmente (64000, 49000) werden ebenso wie die Mehrzahl der zuvor genannten Bruchstücke weiter abgebaut. Nach vierzigminütiger Proteolyse unter den angegebenen Bedingungen waren noch lediglich drei Fragmente mit den Molekulargewichten 67000, 63000 und 38000 vorhanden. Das in der Literatur beschriebene Fragment T5 (26000) konnte nicht nachgewiesen werden.

- EF-G aus Lactobacillus casei (Abb.11)

  Die Proteolyse des EF-G aus L.casei läuft wesentlich langsamer ab, als dies bei E.coli der Fall ist. Noch dreißig Minuten nach Beginn des tryptischen Abbaus ist auf der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der native EF-G zu erkennen. Zudem zeichnet sich EF-G (L.casei) durch eine größere Zahl an Bruchstücken aus. Der Elongationsfaktor wird zunächst zu zwei großen Fragmenten (86000, 84000) abgebaut. Im zeitlichen Verlauf der Trypsinolyse entstehen letztlich vier hauptsächliche Bruchstücke (84000, 78000, 53000, 24000). Daneben bilden sich Spaltprodukte (60000, 56000, 49000) in geringerem Ausmaß. Die beiden 84000- und 78000-Fragmente werden nach vier

Stunden weiter zum 53000-Produkt abgebaut (nicht gezeigt).

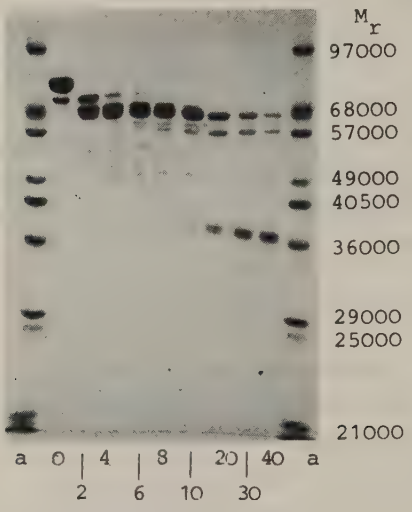


Abb.10: Gelelektrophoretische Analyse (10% Acrylamid) des tryptischen Abbaus von EF-G (E.coli)

(a): Eichproteine; die Proteolysedauer ist in Minuten angegeben.

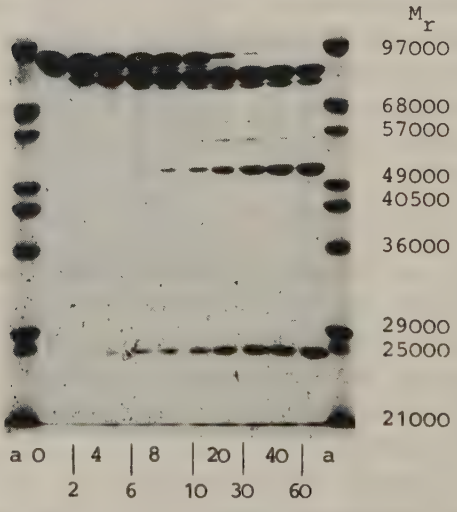


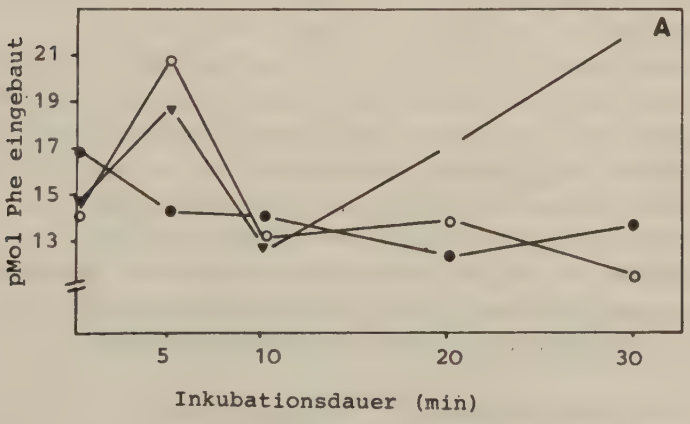
Abb.11: Gelelektrophotetische Analyse (10% Acrylamid) des tryptischen Abbaus von EF-G (L.casei)

(a): Eichproteine; die Proteolysedauer ist in Minuten angegeben.

5. Funktionelle Charakterisierung von EF-G

A. Einfluß von SH-Gruppenreagenzien auf EF-G

EF-G enthält drei freie Sulfhydrylgruppen pro Molekül, von denen zumindest eine für den Ablauf der Proteinbiosynthese essentiell sein soll. Der Einfluß mehrerer Sulfhydryl-Inhibitoren auf die EF-G-Aktivität in der Gesamtreaktion und einzelnen Partialreaktionen (entkoppelte GTP-Hydrolyse, Bildung des {Guaninnukleotid·EF-G·Ribosomen}-Komplexes scheint für die Beteiligung dieser SH-Gruppe an der Guaninnukleotid-Bindungsstelle zu sprechen. Die beschriebenen Resultate variieren jedoch derart, daß bislang keine eindeutige Aussage über die Bedeutung und Funktion dieser Sulfhydrylgruppe möglich ist.
Die Behandlung der Elongationsfaktoren aus E.coli und L.casei mit verschiedenen Konzentrationen an N-Ethylmaleimid erfolgte wie unter II.12.I beschrieben. Zur Überprüfung der Aktivität von EF-G während der NEM-Behandlung wurden nach den angegebenen Zeiten Aliquots entnommen und einer Poly(U)-abhängigen Poly(Phe)-Synthese nach II.12.D unterzogen.
Bei keinem der beiden Elongationsfaktoren konnte ein Effekt von NEM auf die Fähigkeit, die *in vitro*-Translation zu katalysieren, festgestellt werden (Abb.12).



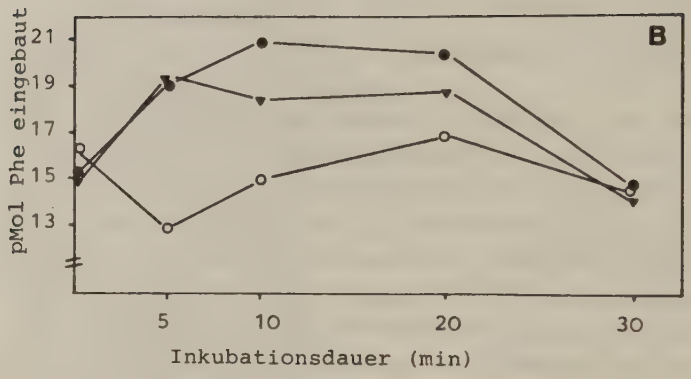


Abb.12: NEM-Behandlung von EF-G
(A): EF-G aus E.coli (B): EF-G aus L.casei
ohne NEM (●); mit 2mM NEM (O); mit 4mM NEM (▼)

B. Temperaturempfindlichkeit von EF-G

Die thermische Stabilität der gereinigten Elongationsfaktoren aus E.coli und L.casei sollte bezüglich ihrer Fähigkeit untersucht werden, die Poly(U)-abhängige Poly(Phe)-Synthese zu katalysieren und die entkoppelte GTPase-Aktivität aufrechtzuerhalten. Die Hitzebehandlung der Elongationsfaktoren und die Durchführung der *in vitro*-Tests erfolgte nach II.12.H.
EF-G (L.casei) erwies sich in beiden Testreaktionen als hitzestabiler, wenn auch der Unterschied in der Poly(Phe)-Synthese nur geringfügig war (Abb.13A). Nach der Vorinkubation bei 50°C war er in beiden Testsystemen unvermindert aktiv; bei 70°C behielt er immerhin noch 34% seiner ursprünglichen Aktivität. Nach fünfminütiger Inkubation bei 70°C zeigte der EF-G aus E.coli in beiden Fällen nur noch eine Restaktivität von 10%. Die Temperaturen, bei denen nach Vorinkubation noch 50% Restaktivität vorhanden waren, wurden wie folgt bestimmt:

EF-G	Poly(Phe)-Synthese	GTP-Hydrolyse
E.coli	65°C	58,5°C
L.casei	67°C	68,5°C

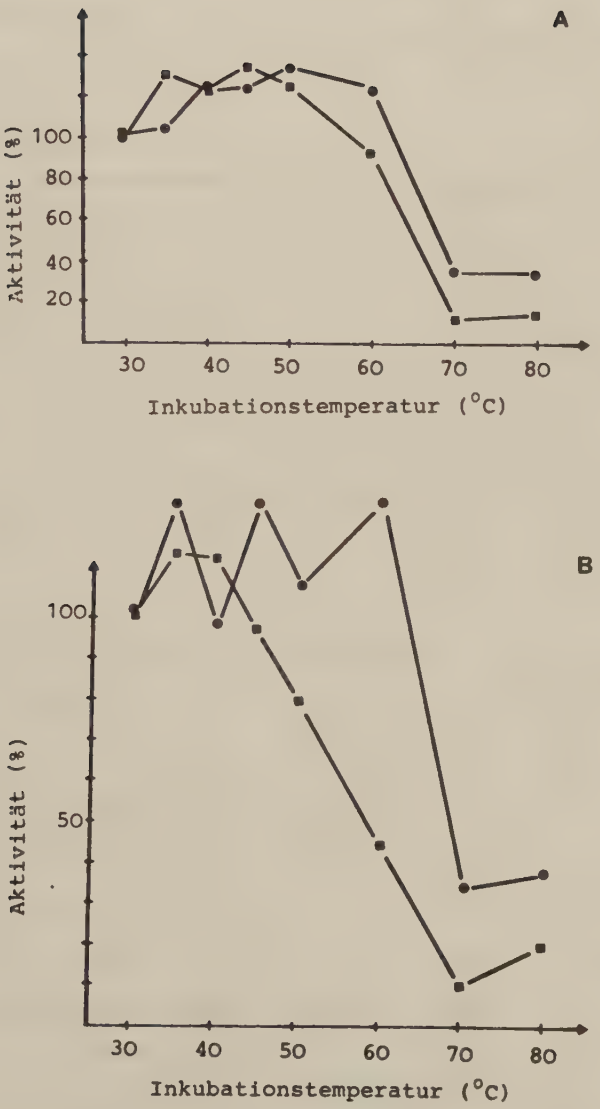


Abb.13: Hitzestabilität von EF-G in der Poly(U)-abhängigen Poly(Phe)-Synthese (A) und der entkoppelten GTPase-Reaktion (B): (■) E.coli; (●) L.casei.

Die verminderte Hitzeempfindlichkeit von EF-G (L.casei) deckt sich auch mit der erhöhten thermischen Stabilität des EF-Tu aus verschiedenen Milchsäurebakterien (WÖRNER,1982).

6. Antibiotika-Empfindlichkeit des Elongationsapparates von L.casei

Die Sensitivität von Lactobacillus casei gegen Hemmstoffe, die die Reaktionen des Elongationscyclus der Proteinbiosynthese beeinflußen, wurde *in vivo* durch Verdünnungsreihentests und im zellfreien System durch Poly(U)-codierte Poly(Phe)-Synthese bestimmt und den für E.coli ermittelten Werten gegenübergestellt. Eine Hemmung der Initiations- oder Terminationsreaktion, die von einigen der verwendeten Antibiotika bekannt ist, wurde durch das *in vitro*-System nicht erfaßt (s. II.12.D).
Die folgenden Tabellen geben einen Überblick über die verwendeten Hemmstoffe, deren Wirkort und Hemmtyp, sowie über die experimentell ermittelten minimalen Hemmkonzentrationen (µg/ml) und ID_{50}-Werte (µM). Die Einteilung der Hemmstoffe erfolgte nach CAMMARANO et al.,1985.

Tabelle 4: Hemmung der Proteinbiosynthese durch eubakterielle Hemmstoffe

Antibiotikum	Hemm-typ	Wirkort	E.coli MIC (µg/ml)	E.coli ID_{50} (µM)	L.casei MIC (µg/ml)	L.casei ID_{50} (µM)
Chloramphenicol	B	50S	1,56	□	3,12	□
Erythromycin	C	50S	12,5	□	0,78	□
Gentamycin	A	30S	3,12	0,3	100	3
Kanamycin	A	30S	12,5	<0,1	>100	<0,1
Kirromycin	A	EF-Tu	>100	0,7	>100	70
Mikamycin A + B	B/C	50S	25	2	0,78	2

Neomycin	A	30S	12,5	<0,1	>100	<0,1
Pulvomycin	A	EF-Tu	> 100	0,5	> 100	> 90
Spectinomycin	C	30S	50	[2]	50	300
Streptomycin	A	30S	12,5	0,9	100	0,3
Thiostrepton	A	50S	> 100	4,5	> 100	4,5
Tobramycin	A	30S	3,12	0,6	> 100	450
Tylosin	B	50S	50	0,3	3,12	0,8
Viomycin	C	30S	> 100	0,1	> 100	< 0,1
Virginiamycin M_1	B	50S	50	3	25	3

Tabelle 5: Hemmung der Proteinbiosynthese durch eubakterielle und eukaryontische Hemmstoffe

Antibiotikum	Hemm-typ	Wirkort	E.coli MIC (µg/ml)	E.coli ID_{50} (µM)	L.casei MIC (µg/ml)	L.casei ID_{50} (µM)
Fusidinsäure	A	EF-G/ EF-2	25	50	>100	>1000
Puromycin	B	50S/ 60S	3,12	90	100	50
Tetracyclin	A	30S/ 40S	3,12	10	1,56	1

Tabelle 6: Hemmung der Proteinbiosynthese durch eukaryontische Hemmstoffe

Antibiotikum	Hemm-typ	Wirkort	E.coli MIC (µg/ml)	E.coli ID_{50} (µM)	L.casei MIC (µg/ml)	L.casei ID_{50} (µM)
Anisomycin	B	60S	> 100	> 100	> 100	> 100

Cycloheximid	C	60S	>100	>100	>100	>100
Emetin	C	40S	>100	>100	>100	>100
Ricin[3]	A	60S	>100	200	>100	100

[1] Chloramphenicol und Erythromycin sind inaktiv im Poly(U)-System

[2] keine Hemmung mit Poly(U) als Matrize bei E.coli

[3] ID_{50}-Angabe in µg/ml

Die Durchführung der Verdünnungsreihentests und der Poly(U)-abhängigen Poly(Phe)-Synthese erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben. Die Antibiotika wurden eingeteilt nach der spezifischen Reaktion, die sie im Elongationscyclus beeinflußen: (A) Bindung der Aminoacyl-tRNA, (B) Peptidyltransfer, (C) Translokation (VAZQUEZ,1979).

MIC: minimale Hemmkonzentration im Verdünnungsreihentest

ID_{50}: diejenige Inhibitorkonzentration, die eine 50%ige Hemmung der Poly(Phe)-Synthese bewirkt. Die Werte wurden den Schaubildern im Anhang entnommen.

A. Hemmung der Poly(U)-abhängigen Poly(Phe)-Synthese

Die Untersuchung der *in vitro*-Proteinbiosynthese ergab für L.casei eine natürliche Wirkortresistenz gegenüber den Antibiotika, die an einem der beiden löslichen Elongationsfaktoren angreifen.

Für Kirromycin wurde ein ID_{50}-Wert von 70µM beim EF-Tu aus L.casei ermittelt. Dies übertrifft den für E.coli bestimmten Wert (0,7µM) um das Hundertfache.

Der Elongationsfaktor Tu des untersuchten Milchsäurebakteriums erwies sich auch gegen Pulvomycin als natürlich wirkortresistent. Selbst bei der höchsten eingesetzten Pulvomycin-Konzentration (0,1mM) wurde keine merkliche Hemmung beobachtet. Im Vergleich dazu wurde die Poly(Phe)-Synthese, katalysiert durch EF-Tu aus E.coli, schon durch eine Pulvomycin-Konzentration von 0,5µM zu 50% gehemmt.

Fusidinsäure hemmt die Proteinbiosynthese durch Interaktion mit dem Elongationsfaktor G. Für E.coli wurde die Konzentration, die eine 50%ige Hemmung der Testreaktion bewirkt, zu 50µM bestimmt. EF-G aus L.casei war gegen Fusidinsäure völlig unempfindlich. Auch bei einer Hemmstoff-Konzentration von 1mM konnte kein Effekt auf die Poly(U)-abhängige Poly(Phe)-Synthese ermittelt werden. L.casei ist somit das erste bekannte Eubakterium, das gegen Fusidinsäure eine natürliche Wirkortresistenz aufweist.

Das Aminoglykosid-Antibiotikum Tobramycin hemmt die Poly(Phe)-Synthese, katalysiert durch 70S Ribosomen aus E.coli, bei einer Konzentration von 0,6µM zu 50%. Ein entsprechender Effekt wird mit den Ribosomen aus L.casei erst bei 450µM erzielt. Auch hier zeichnet sich das Testsystem aus L.casei durch einen veränderten Wirkort aus, der für die ermittelte Tobramycin-Resistenz verantwortlich ist. Tobramycin zeigt neben dem für Aminoglykoside charakteristischen misreading-Effekt auch eine Hemmung der EF-G-abhängigen Translokationsreaktion.

Spectinomycin verursacht hingegen kein nachweisbares misreading in der Proteinbiosynthese. Die Translation wird in E.coli und zellfreien Extrakten unter Beteiligung von natürlicher mRNA gehemmt. Bei Verwendung einer synthetischen Matrize ist der Effekt entscheidend von deren Nukleotidzusammensetzung abhängig (ANDERSON et al.,1967). Mit Poly(U) oder Poly(A) erfolgt keine Hemmung der Proteinbiosynthese. Nur mit Poly(I) oder steigendem Guanin/Cytosin-Gehalt in gemischten Polymeren kann eine Hemmung ermittelt werden. Spectinomycin scheint ebenfalls in die Translokationsreaktion einzugreifen. Die Poly(U)-abhängige Poly(Phe)-Synthese mit Ribosomen aus L.casei zeigt dagegen bei steigenden Konzentrationen an Spectinomycin einen deutlich verminderten Einbau von Phenylalanin in säureunlösliches Material. Der ID_{50}-Wert wurde mit 300µM ermittelt.

Hinsichtlich aller weiteren untersuchten und am Ribosom angreifenden Hemmstoffe zeigt das *in vitro*-System von L.casei eine identische oder kaum merklich unterschiedliche Empfindlichkeit wie das System aus E.coli.

Keiner der untersuchten eukaryontischen Hemmstoffe hatte einen Effekt auf die Proteinbiosynthese bei L.casei. Die für Ricin ermittelten Werte für eine 50%ige Hemmung beruhen sehr wahrscheinlich auf einer unspezifischen Wirkung, verursacht durch die hohen Proteinkonzentrationen im Testansatz (100 bzw. 200 µg Ricin/ml).

B. Minimale Hemmkonzentrationen

Durch die Empfindlichkeit der Poly(Phe)-Synthese konnte für die Mehrzahl der untersuchten Antibiotika eine Wirkortresistenz ausgeschlossen werden. Die im Verdünnungsreihentest festgestellten Resistenzen beruhen daher vermutlich auf einer verminderten Eindringung des Hemmstoffes.
E.coli zeigt neben der Eindringungsresistenz gegen Kirromycin und Pulvomycin auch eine verminderte Empfindlichkeit gegen Fusidinsäure.
Beide Testorganismen zeigen *in vivo* Resistenzen gegen Thiostrepton und Viomycin.
Trotz eines sensitiven Wirkortes erwies sich L.casei als unempfindlich gegenüber Gentamycin, Kanamycin, Neomycin, Streptomycin und Puromycin.
Für Tobramycin wurde bei L.casei ein unempfindlicher Wirkort ermittelt; aufgrund der strukturellen Verwandtschaft mit den aufgeführten Aminoglykosiden liegt die Vermutung nahe, daß Tobramycin darüberhinaus auch in vermindertem Maße in die Zelle aufgenommen wird.

Tabelle 7: Empfindlichkeit von E.coli und L.casei gegen einige ausgewählte Antibiotika

	E.coli		L.casei	
	in vivo	*in vitro*	*in vivo*	*in vitro*
Fusidinsäure	±	+	-	-
Gentamycin	+	+	-	+
Kanamycin	+	+	-	+
Kirromycin	-	+	-	-
Neomycin	+	+	-	+
Pulvomycin	-	+	-	-

Spectinomycin	-	-	-	+
Streptomycin	+	+	-	+
Tobramycin	+	+	-	-

(+): Hemmung (-): keine Hemmung

7. Untersuchungen zur Fusidinsäure-Resistenz von EF-G aus L.casei

A. Hemmung der Poly(U)-abhängigen Poly(Phe)-Synthese

Die Poly(Phe)-Synthese in Abhängigkeit von Fusidinsäure wurde in Abänderung zu Abschnitt II.12.D mit 5pMol EF-G (E.coli) bzw. 2,2pMol EF-G (L.casei) durchgeführt. Da die Elongationsfaktoren aus Milchsäurebakterien mit dem System aus E.coli kompatibel sind wurden in beiden Fällen Ribosomen aus E.coli verwendet.
Die in Abb.14 angegebenen Werte beziehen sich auf den Einbau von [^{14}C]-Phe in TCA-unlösliches Poly(Phe) bei Abwesenheit von Fusidinsäure (100%).
Um eine 50%ige Hemmung der Poly(Phe)-Synthese zu erreichen war beim EF-G aus E.coli eine Fusidinsäure-Konzentration von 50µM nötig. Der Elongationsfaktor aus L.casei wurde selbst bei 1mM Fusidinsäure im Testansatz nicht beeinträchtigt.

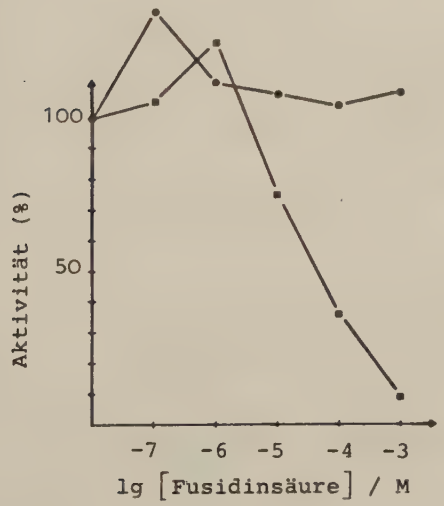
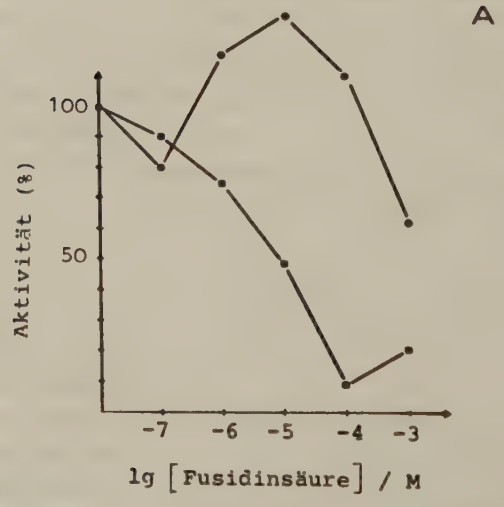


Abb.14: Hemmung der zellfreien Proteinsynthese durch Fusidinsäure
(■) E.coli; (●) L.casei

B. Hemmung der EF-G-abhängigen GTP-Hydrolyse

Noch bevor die Rolle des Elongationsfaktors G in der Translokation bekannt war oder Modellvorstellungen über deren Ablauf existierten, war die Fähigkeit von EF-G bekannt, die Hydrolyse von GTP zu katalysieren. Sie war es auch, die dem Faktor seine Bezeichnung gab. Die Spaltung des Guaninnukleotids erfolgt hierbei unmittelbar auf die Teilreaktionen der Translokation (Wechsel der Peptidyl-tRNA von der A-Site auf die P-Site; Freisetzung der deacylierten tRNA von der P-Site und Weiterrücken der mRNA um ein Codon). EF-G zeigt jedoch auch in Abwesenheit von mRNA und tRNA nur im Komplex mit 70S Ribosomen eine GTPase-Aktivität. Da diese GTP-Hydrolyse nicht mit einer Translokation verbunden ist, bezeichnet man sie auch als 'entkoppelt'. Für die entkoppelte GTP-Hydrolyse durch EF-G ist schon die Anwesenheit von ribosomalen 50S-Untereinheiten ausreichend; die 30S- Untereinheit zeigt sich in dieser Hinsicht als inaktiv. In Gegenwart von Fusidinsäure wird diese entkoppelte GTP-Hydrolyse gehemmt, indem der {Ribosomen·EF-G·GDP}-Komplex stabilisiert wird.
Die Abhängigkeit der ent- und gekoppelten GTP-Hydrolyse von der Konzentration an Fusidinsäure wurde nach Abschnitt II.12.E ermittelt (Abb.15).



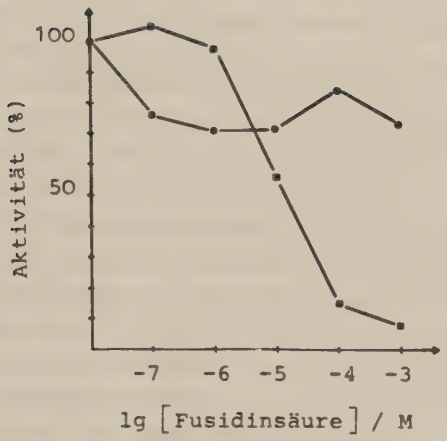


Abb.15: Hemmung der EF-G-abhängigen GTP-Hydrolyse durch Fusidinsäure
(A): entkoppelt (B): gekoppelt
(■) E.coli; (●) L.casei

Eine 50%ige Hemmung der entkoppelten GTPase ergab sich im Falle des Elongationsfaktors G aus E.coli bei einer Fusidinsäure-Konzentration von 9µM. Auch mit der höchsten eingesetzten Hemmstoffkonzentration konnte mit EF-G (L.casei) dieser Effekt nicht erzielt werden.
Für die gekoppelte GTP-Hydrolyse in Anwesenheit von Poly(U), tRNA und Phe-tRNA wurde für EF-G (E.coli) ein ID_{50}-Wert von 20µM ermittelt. Der Elongationsfaktor aus L.casei erwies sich auch hier als resistent gegenüber dem Antibiotikum (Tabelle 8).

Tabelle 8: Hemmung der ent- und gekoppelten GTPase-Reaktion durch Fusidinsäure

	E.coli ID_{50} (µM)	L.casei ID_{50} (µM)
entkoppelte GTPase	9	>1000
gekoppelte GTPase	20	>1000

C. Hemmung der Bindung von EF-Tu·GTP·Phe-tRNA an 70S Ribosomen

Die Hemmung der Translokation stellt nicht den eigentlichen Effekt von Fusidinsäure auf den Ablauf der Proteinbiosynthese dar. Vielmehr findet auch in Gegenwart von Fusidinsäure ein Translokationsschritt unter Spaltung von GTP statt.Der entstandene {Ribosomen·EF-G·GDP}-Komplex wird jedoch durch Fusidinsäure stabilisiert. Da beide Elongationsfaktoren (EF-G und EF-Tu) dieselbe ribosomale Bindungsstelle besitzen, kann sich der ternäre Komplex EF-Tu·GTP·AA-tRNA nicht mehr an das Ribosom anlagern.Sowohl die EF-Tu-abhängige GTP-Hydrolyse wie auch die Bindung der Aminoacyl-tRNA an die ribosomale A-Site wird durch die vorhergehende Bindung von EF-G in Gegenwart von GTP und Fusidinsäure bzw. nichthydrolysierbaren Analoga verhindert. Dies scheint der eigentliche Teilschritt des Elongationscyclus zu sein, der durch Fusidinsäure unterbunden wird. Der ID_{50}-Wert für diese Teilreaktion lag beim EF-G (E.coli) bei 300µM Fusidinsäure. EF-G aus L.casei zeigte bei 1mM Fusidinsäure eine nahezu unverminderte Bindung des ternären Komplexes (Abb.16).

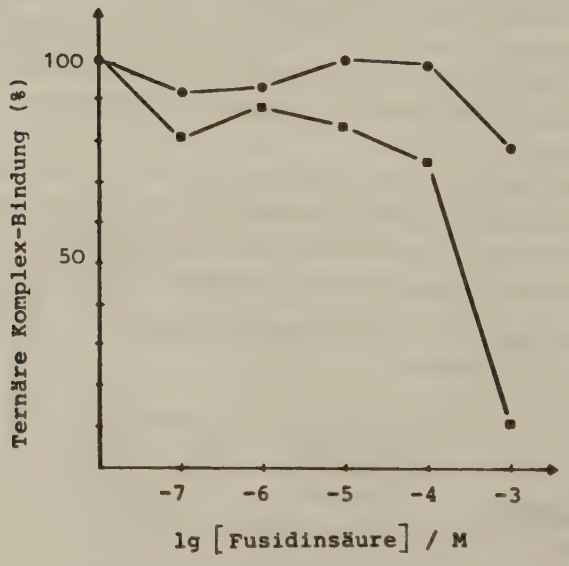


Abb.16: Hemmung der ternären Komplex-Bindung durch Fusidinsäure
Die Angaben beziehen sich auf die Bindung des Komplexes EF-Tu·GTP·AA-tRNA in Abwesenheit des Antibiotikums; (■) E.coli; (●) L.casei.

D. Hemmung der Poly(Phe)-Synthese mit EF-G (E.coli) durch Fusidinsäure; Titration mit EF-G (L.casei)

Als Resultat der Bindung von Fusidinsäure an EF-G entsteht im Elongationscyclus ein stabiler {Fusidinsäure·EF-G·GDP·Ribosomen}-Komplex. Es sollte im folgenden getestet werden, ob der Fusidinsäure-resistente EF-G aus L.casei diese Hemmung aufheben kann. Hierzu wurde die Poly(U)-abhängige Poly(Phe)-Synthese unter Beteiligung des sensitiven EF-G (E.coli) mit 10^{-3}M Fusidinsäure gehemmt. Die Wirkung steigender Mengen EF-G (L.casei) auf den Einbau von [^{14}C]-Phenylalanin in säureunlösliches Material wurde gemäß II.12.L ermittelt. Zum Vergleich wurde die durch EF-G aus E.coli in Abwesenheit von Fusidinsäure katalysierte Poly(Phe)-Synthese herangezogen (Abb.17).

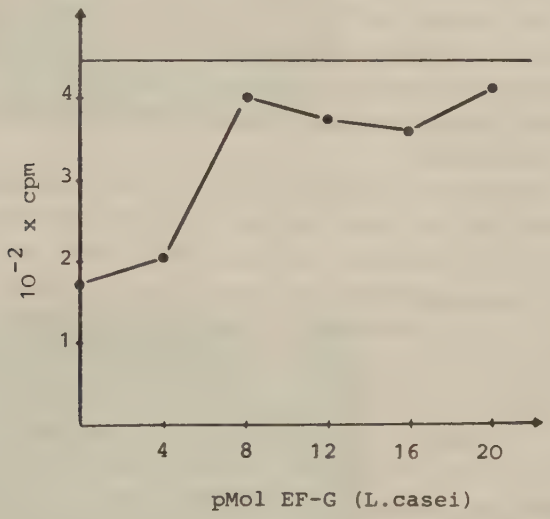


Abb.17: Aufhebung der Hemmung der Poly(Phe)-Synthese durch steigende Mengen von EF-G (L.casei)
(-) Poly(Phe)-Synthese ohne Fusidinsäure mit EF-G (E.coli); (●) Poly(Phe)-Synthese mit 1mM Fusidinsäure,EF-G (E.coli) und variablen Mengen EF-G (L.casei).

Schon bei Zugabe von 9pMol EF-G (L.casei) konnte die Hemmung der *in vitro*-Translation aufgehoben und die ursprünglichen Werte (E.coli/ohne Fusidinsäure) nahezu erreicht werden. Der Elongationsfaktor G aus L.casei besitzt demnach eine hohe Affinität zu seiner ribosomalen Bindungsstelle. Die Affinität übersteigt die des {Fusidinsäure·EF-G·GDP}- und des EF-Tu·GTP·Phe-tRNA-Komplexes aus E.coli.

8. Untersuchungen zur Interaktion zwischen EF-G (L.casei) und tRNA

A. Tryptische Hydrolyse von EF-G in Gegenwart von tRNA

IF-2 und EF-Tu binden in Abhängigkeit vom Guaninnukleotid fMet-tRNA$_f^{Met}$ bzw. AA-tRNA und transportieren diese zum Ribosom. Nach Hydrolyse des Guaninnukleotids verlassen beide Faktoren das Ribosom; die beladenen tRNA-Spezies verbleiben jedoch an ihren ribosomalen Bindungsstellen und dienen als Substrate für die Peptidyltransferase.
Die Funktion von EF-G im Elongationscyclus umfaßt auch die Freisetzung deacylierter tRNA aus dem Pretranslokations-Zustand. Es erscheint möglich, daß EF-G hierzu, ebenso wie die anderen Faktoren, eine Wechselwirkung mit tRNA eingeht. Falls eine Bindung von tRNA zu einer veränderten Konformation führt, könnte dies u.U. durch einen modifizierten Trypsin-Verdau nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurde die tryptische Hydrolyse von EF-G nach II.12.G in Gegenwart von deacylierter tRNA durchgeführt. EF-G (E.coli) zeigte hierbei ein jeweils identisches Spaltmuster, unabhängig davon ob tRNA zugegen war oder nicht.
Die tryptische Proteolyse von EF-G (L.casei) wies jedoch bei Anwesenheit von tRNA hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs und der Mengenverhältnisse der entstandenen Bruchstücke deutliche Unterschiede auf.
EF-G (L.casei) wird in Gegenwart von tRNA langsamer abgebaut; die beiden großen Bruchstücke (84000, 78000) entstehen in geringeren Mengen bzw. werden sofort weiter abgebaut (78000). Demgegenüber erscheinen das 60000-Bruchstück und das 56000-Fragment in deutlich größeren Mengen.

Diese Resultate lassen sich eigentlich nur durch Wechselwirkung der tRNA mit EF-G bzw. den entstandenen Bruchstücken erklären.
Abb.18 zeigt die gelelektrophoretische Analyse der Proteolyseprodukte von EF-G (L.casei) in beiden Fällen.

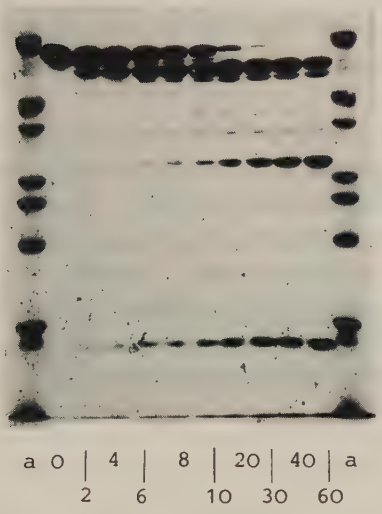


Abb.18A: Gelelektrophoretische Analyse (10% Acrylamid) der tryptischen Proteolyse von EF-G (L,casei)
(a): Eichproteine; die Proteolysedauer ist in Minuten angegeben.

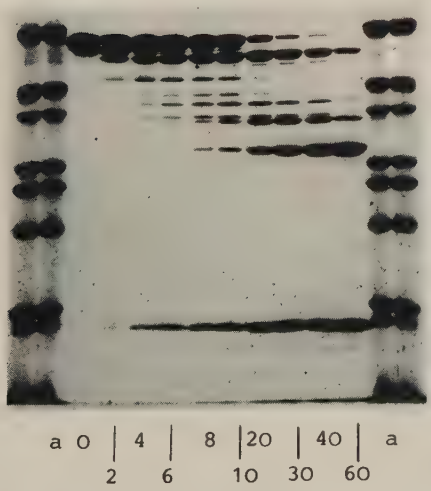
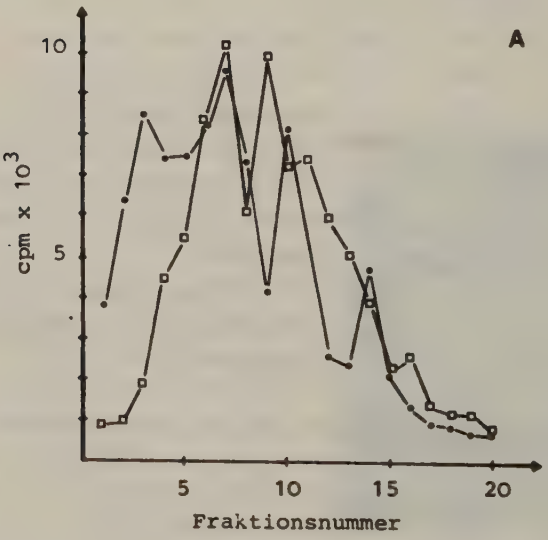


Abb.18B: Gelelektrophoretische Analyse (10% Acrylamid) der tryptischen Proteolyse von EF-G (L.casei) in Gegenwart von tRNA
(a): Eichproteine; die Proteolysedauer ist in Minuten angegeben.

B. Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation von EF-G und tRNA

EF-G (L.casei) und tRNA aus E.coli MRE 600 wurden jeweils getrennt bzw. als Gemisch einer Dichtegradientenzentrifugation unterworfen (II.12.N). Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend durch Komplettierung der Poly(Phe)-Synthese auf EF-G getestet. tRNA wurde durch enzymatische Beladung mit $[^{14}C]$-Phe und Adsorption der $[^{14}C]$-Phe-tRNA auf 3MM Filter nachgewiesen. Dabei ergaben sich die in Abb.19 dargestellten Aktivitätsprofile.
Sowohl der Elongationsfaktor als auch die deacylierte tRNA wurden in Anwesenheit der jeweils anderen Komponente deutlich zum Boden des Zentrifugenröhrchens verschoben. Dies deutet auf ein jeweils erhöhtes Molekulargewicht hin, das durch Bindung von tRNA an EF-G erklärbar wäre. Mehrfache Wiederholungen des Versuchs ergaben jedoch in Einzelfällen widersprüchliche Ergebnisse, so daß eine eindeutige Aussage letztlich noch aussteht. Zu diesem Zweck müßten weitere reproduzierbare Methoden herangezogen werden.



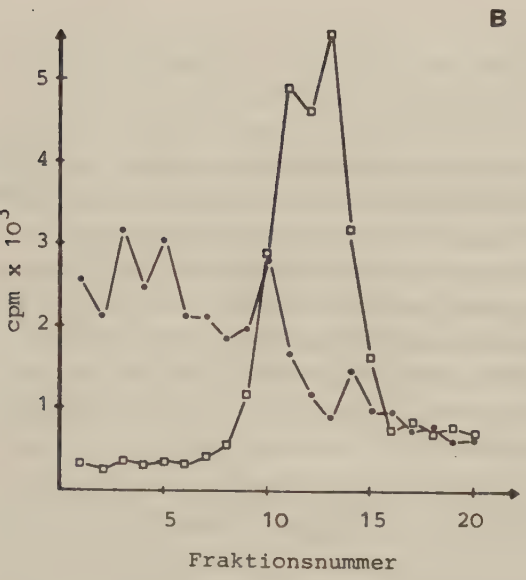


Abb.19: Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation von EF-G und tRNA

(A): EF-G (□); EF-G in Anwesenheit von tRNA (●)

(B): tRNA (□); tRNA in Anwesenheit von EF-G (●)

IV. D I S K U S S I O N

Für den Zellaufschluß von Milchsäurebakterien erwies sich das Zerreiben mit Aluminiumoxid als bislang einfachstes und wirkungsvollstes Verfahren und wurde deshalb auch hier beibehalten. Dem Elutions- und Säulenpuffer wurde neben EDTA, das metallionenabhängige Proteasen hemmt, ferner PMSF zugesetzt, um die Wirkung von Serinproteasen zu unterdrücken. Zugabe von GDP stabilisiert den EF-Tu und verdrängt zudem EF-Ts aus dem EF-Tu·EF-Ts-Komplex, so daß dieser Elongationsfaktor üblicherweise als EF-Tu·GDP isoliert wird.

Die Präparation von Ribosomen erfolgte bei beiden Organismen nach der Methode von STAEHLIN und MAGLOTT (1971) und lieferte aktive 70S Partikel. Die Mengenbestimmung der Ribosomen erfolgte durch Absorptionsmessung bei 260 nm. Für verschiedene Präparationen ergaben sich bei L.casei hierbei Werte zwischen 400 und 2100 A_{260}-Einheiten/ml.
Tween 80 aus dem MRS-Medium zeigte in den zu erwartenden Konzentrationen keinen Einfluß auf die Aktivität der Ribosomen aus L.casei in der *in vitro*-Translation. Die Ergebnisse der Poly(U)-abhängigen Poly(Phe)-Synthese mit Ribosomen (L.casei) und variablen Mengen an Mn^{2+}-Ionen (5-20mM) ließen einen hemmenden Einfluß dieses Metallions vermuten, so daß auch hier die *in vitro*-Testsysteme mit Standardpuffer durchgeführt wurden.
Eine alternative Reinigungsmethode für 70S Ribosomen (JELENC, 1980) durch Chromatographie des Zellextraktes an Sephacryl S 200 brachte keine befriedigenden Ergebnisse und wurde im weiteren nicht verwendet. Zur Isolierung kleinerer Mengen an Ribosomen und zur Vorbehandlung älterer Präparationen erwies sich die Zentrifugation in der Airfuge als äußerst vorteilhaft. Die Ribosomen konnten hierbei schon in wenigen Minuten pelletiert werden.

Beide ribosomalen Untereinheiten enthalten, neben rRNA eine unterschiedliche Zahl von Proteinen die, mit Ausnahme von L7/L12 bzw. S20/L26, jeweils einfach pro 70S Partikel enthalten sind. Die Mehrzahl ribosomaler Proteine weist Molekulargewichte von 10000 bis 30000 auf; nur wenige (z.B. L1) sind beträchtlich größer (WITTMANN,1974).
Die Primärstrukturen ribosomaler Proteine verhielten sich im Laufe der Evolution außergewöhnlich konservativ. Selbst entsprechende Proteine aus taxonomisch unterschiedlichen Eubakterien enthalten bis zu 50% identische Aminosäuren (OSAWA et al.,1980).
KALTSCHMIDT und WITTMANN (1970) konnten durch zweidimensionale Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen sämtliche ribosomalen Proteine voneinander trennen. Die erste elektrophoretische Trennung in einem wenig konzentrierten Polyacrylamid-Gel (8%) bei leicht alkalischem pH läßt die große Zahl basischer Proteine aufgrund ihrer Ladung zur Kathode wandern; die wenigen sauren oder neutralen Proteine bewegen sich zur Anode. Die Elektrophorese in der zweiten Dimension trennt die ribosomalen Proteine bei einem pH von 4,6 (18% Acrylamid) hauptsächlich aufgrund ihrer Größe. Die Trennung ribosomaler Proteine durch zweidimensionale Gelelektrophorese bildet auch die Grundlage ihrer Nomenklatur.
Das Proteinmuster aus 70S Ribosomen (L.casei) unterscheidet sich deutlich von dem aus E.coli MRE 600. Insbesondere die Proteine S10 und L21 (nach der Nomenklatur für E.coli Proteine) weisen bei L.casei ein völlig verändertes Laufverhalten auf. Die Zahl der ribosomalen Proteine hingegen scheint bei beiden Organismen ähnlich zu sein. Sowohl die sauren Proteine L7, L12 und S6, wie auch das basische Protein L34 wandern bei der elektrophoretischen Trennung in der ersten Dimension am weitesten in Richtung der Pole. Um sie auf dem Gel nachzuweisen hätte es einer kürzeren Laufzeit bedurft, was jedoch mit einer geringeren Auflösung der großen Zahl basischer Proteine verbunden gewesen wäre. Quantitative Unterschiede zwischen einzelnen ribosomalen Proteinen können dadurch bedingt sein, daß spezifische Protein-RNA-Wechselwirkungen auch nach der Essig-

säure-Extraktion noch bestehen bleiben und die betroffenen Proteine so nur in geringen Mengen auf dem Gel erscheinen. Andererseits können Proteine des Zellextrakts (z.B. IF-3) während der Isolierung an 70S Ribosomen gebunden bleiben und als zusätzliche Proteine im Elektrophoresemuster sichtbar werden. Unspezifische Banden im oberen Teil des Gels mit Molekulargewichten über 40000 stellen gewöhnlich Aggregate ribosomaler Proteine dar, die durch Knüpfung von Disulfidbrücken zustande kommen (KALTSCHMIDT und WITTMANN,1970a). Eine weitere Zuordnung der ribosomalen Proteine aus L.casei wäre nur mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen die analogen Proteine aus E.coli möglich gewesen.

Das Ribosom mit seinen mehr als 50 Proteinen und drei RNA-Spezies stellt ein ausgezeichnetes Mittel dar, um die Evolution von Makromolekülen zu untersuchen (GEISSER et al.,1973). Sowohl der self-assembly-Prozeß des Ribosoms, als auch seine Funktionsabläufe während der Proteinbiosynthese (Bindung von AA-tRNA, Faktoren u.a.) erfordern gezielte kooperative Wechselwirkungen zwischen den einzelnen ribosomalen Komponenten. Zur Aufrechterhaltung dieser multiplen Interaktionen war es nötig Struktur und Funktion der ribosomalen Bestandteile während der Evolution zu erhalten. Homologe Proteine aus verschiedenen Bakterien erfüllen dieselbe Funktion und können *in vitro* gegeneinander ausgetauscht werden (NOMURA et al., 1968; HIGO et al.,1973; TISCHENDORF et al.,1973).

Unterschiede im elektrophoretischen Laufverhalten ribosomaler Proteine können dazu dienen,phylogenetische Beziehungen zwischen den untersuchten Organismen aufzudecken (HORI et al.,1978). GEISSER et al. (1973,1973a) verglichen die Elektrophoresemuster der ribosomalen Proteine verschiedener Enterobacteriaceae und Bacillaceae miteinander. Während die Proteinmuster der untersuchten Enterobacteriaceae einander sehr ähnlich sind, zeigten die Bacillus-Spezies (auch im Vergleich mit E.coli) deutliche Unterschiede.

Die Reinigung der Elongationsfaktoren aus L.casei erfolgte nach WÖRNER (1982). Sie umfaßt in der angegebenen Reihenfolge eine Chromatographie an DEAE-Sepharose, Phenyl-Sepharose und Sephadex G 100. Gegenüber dem zuvor verwendeten DEAE-Sephadex zeigt DEAE-Sepharose v.a. den Vorteil günstigerer Fließeigenschaften (LEBERMAN et al.,1980). Eine Abtrennung von Ribosomen aus dem S 30 Extrakt war folglich nicht nötig. Andererseits konnte der Durchlauf der DEAE-Sepharose-Chromatographie zur Präparation von 70S Ribosomen herangezogen werden. Die derart isolierten Ribosomen waren ebenso aktiv, wie die direkt aus dem S 30 durch Ultrazentrifugation gewonnenen.
EF-G und EF-Tu eluierten bei diesem ersten Reinigungsschritt als zwei Aktivitätsmaxima, die jedoch zum Teil überlappten. Durch sorgfältige Auswahl der zu poolenden Fraktionen konnten beide Elongationsfaktoren nahezu voneinander getrennt werden. Zwei getrennte Aktivitätspeaks von EF-Tu·GDP und EF-Tu·EF-Ts, wie sie WÖRNER (1982) bei L.brevis beschreibt, wurden nicht gefunden. Das Maximum der Proteinkonzentration deckt sich mit den Elutionsprofilen der beiden Faktoren, die einen erheblichen Teil des löslichen Proteins der Zelle stellen. Bei E.coli bildet allein EF-Tu ungefähr 5% des Gesamtproteins der Bakterienzelle (FURANO,1975; JACOBSON et al.,1976).
EF-G und EF-Tu wurden jeweils gepoolt und einer hydrophoben Chromatographie an Phenyl-Sepharose unterworfen. Die Elution mit einem fallenden Salzgradienten ergab bei beiden Proteinen breite Aktivitätsmaxima, so daß, um den Verlust größerer Aktivitätsmengen zu vermeiden, wieder umfassend gepoolt werden mußte. Dies stellt sicherlich den größten Nachteil dieses Reinigungsschrittes dar. Abschließend erfolgte eine Gelfiltration an Sephadex G 100.
Die gelelektrophoretische Analyse zeigte eine hohe Reinheit der beiden Elongationsfaktoren an. Die spezifische Aktivität von EF-Tu war mit 130000U/mg Protein höher als erwartet. Bei der analogen Reinigung von EF-Tu aus Lactobacillus acidophilus wurde nur eine spezifische Aktivität von ca. 2500U/mg erreicht (WASILIU,1983). Bei der Präparation des Elongationsfaktors Tu aus verschiedenen Actinomyceten (GLÖCKNER,1985) lagen die

spezifischen Aktivitäten bei 3000 bis 5000U/mg.
Zur Quantifizierung von EF-G kann die Poly(U)-abhängige Poly-(Phe)-Synthese nur näherungsweise dienen. Insbesondere besteht kein linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten Menge EF-G und der Menge $[^{14}C]$-Phe, die in säureunlösliches Material eingebaut wird.
Die gewählte Isolierungsmethode nach WÖRNER zeichnet sich v.a. durch einen relativ geringen Zeitaufwand und die Vermeidung von Fällungsschritten aus, die oftmals mit beträchtlichen Aktivitätsverlusten und zeitaufwendigen Dialyseschritten einhergehen. Insbesondere zur Isolierung der Elongationsfaktoren aus Milchsäurebakterien erwies sie sich als Methode der Wahl. ROHRBACH et al. (1974) beschreiben eine alternative Reinigungsmethode für EF-G aus E.coli, in der der Elongationsfaktor in Anwesenheit von Fusidinsäure an Ribosomen gebunden wird. Der {Fusidinsäure·EF-G·GDP·Ribosomen}-Komplex wird durch Ultrazentrifugation isoliert. Als weitere Reinigungsschritte folgen Chromatographien an DEAE-Sephadex A 50 und Sephadex G 150. Um bei der Isolierung der Elongationsfaktoren aus beiden Organismen gleiche Bedingungen einzuhalten, wurde bei E.coli auf diese Isolierungsmethode verzichtet.

Die bislang untersuchten Elongationsfaktoren zeigen eine beträchtliche Heterogenität bezüglich ihres Molekulargewichtes. Der Elongationsfaktor Tu aus L.casei mit einem ermittelten Molekulargewicht von 52000 zählt ebenso wie die Faktoren aus anderen Milchsäurebakterien zu den größten bislang bekannten EF-Tu-Spezies (WÖRNER et al.,1983). Ein ähnlich hohes Molekulargewicht zeigten nur die Elongationsfaktoren Tu aus Thermus thermophilus (ARAI et al.,1978) und Halobacterium cutirubrum (KESSEL et al.,1981) mit jeweils 51000. Eine umfangreiche Untersuchung des EF-Tu bei Actinomyceten (GLÖCKNER et al.,1985) ergab Molekulargewichte zwischen 46000 und 49000. Pseudomonas fluorescens bildet mit 39000 die untere Begrenzung dieses Spektrums (LUCAS-LENARD et al.,1974).
Der Elongationsfaktor G aus E.coli besitzt ein Molekulargewicht von 80000 (OVCHINIKOV et al.,1982). Für den analogen Faktor

aus L.casei wurde mit 92000 ein deutlich höherer Wert bestimmt, der dem eukaryontischen EF-2 (93000; Rattenleber) gleichkommt (NILSSON et al.,1985). Dies entspricht einer Polypeptidkette aus ca. 800 Aminosäuren.
Für den partiell gereinigten Elongationsfaktor Ts aus L.casei wurde ein Molekulargewicht von 35000 bestimmt. Auch dies liegt über dem entsprechenden Wert bei E.coli (31000; HACHMANN et al.,1971).

Tabelle 9: Molekulargewichte von Elongationsfaktoren

	EF-Tu	EF-Ts	EF-G
E.coli	43225	31000	80000
L.casei	52000	35000	92000
Pseudomonas fluorescens	39000	19000	
Thermus thermophilus	51000	27000	78000
Bacillus stearotherm.	51000	37000	85000

(zur Übersicht s. LUCAS-LENARD et al.,1974)

EF-Tu bedarf zur Katalyse des GDP/GTP-Austausches der Wirkung von EF-Ts. Weitere Faktoren der Proteinbiosynthese, die ein solches 'Hilfsprotein' benötigen, sind eIF-2, EF-1α und RF. EF-G hingegen, wie auch EF-2 und IF-2, braucht zu diesem Zweck kein weiteres Polypeptid. Auffallenderweise entspricht das Molekulargewicht derjenigen Faktoren, die den GDP/GTP-Austausch selbstständig katalysieren ungefähr dem Zweifachen der übrigen Proteinsynthesefaktoren. Es erscheint denkbar, daß die Fähigkeit zur GTP-Bindung und zur Katalyse des Guaninnukleotidaustausches bei diesen Proteinen durch Genfusion auf einer Polypeptidkette vereint wurden (HUGHES,1983).

Der isoelektrische Punkt von EF-G (L.casei) war mit 4,7 niedriger als bei E.coli (5,5). Entsprechendes wurde auch bei der Charakterisierung des Elongationsfaktors Tu aus Lactobacillus acidophilus nachgewiesen (WASILIU,1983).

Die milde tryptische Hydrolyse von EF-G aus E.coli, die Molekulargewichtsbestimmung der entstehenden Fragmente und die Festlegung ihrer Anordnung im nativen Protein stellten wichtige Schritte auf dem Weg zur Ermittlung der Primärstruktur dieses Elongationsfaktors dar (OVCHINIKOV et al.,1982).
EF-G (E.coli) bildet bei Trypsin-Behandlung mehrere Fragmente, die gegen einen weiteren enzymatischen Abbau relativ unempfindlich sind. Offensichtlich scheinen die entstehenden Bruchstücke eine kompakte Struktur zu besitzen und möglicherweise bestehen sie schon im intakten Protein als einzelne unabhängige Funktionsdomänen (ALAKHOV et al.,1979).
Abb. 20 zeigt schematisch die Anordnung der tryptischen Bruchstücke in der Polypeptidkette des nativen EF-G.

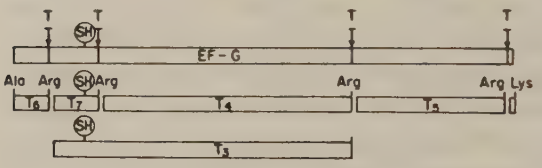


Abb.20: Anordnung der Fragmente der tryptischen Hydrolyse entlang der Polypeptidkette des G-Faktors (E.coli); nach OVCHINIKOV et al.,1982.

SKAR et al.,(1975) stellten ein Schema der tryptischen Hydrolyse vor, nach dem EF-G rasch zu Fragment T_1 abgebaut wird. T_1 wird gespalten in die Fragmente T_3 und T_5. Fragment T_4 geht wiederum aus T_3 durch Abspalten eines kurzkettigen Peptides hervor. Die von verschiedenen Arbeitsgruppen bestimmten Molekulargewichte von EF-G und seinen proteolytischen Spaltprodukten unterscheiden sich jedoch deutlich.
Die in der Literatur beschriebenen Bruchstücke konnten im zeitlichen Verlauf der Hydrolyse zwar nachgewiesen werden, sind jedoch mengenmäßig kaum von Bedeutung. Fragment T_5 (25000) wurde überhaupt nicht gebildet. Diese Unterschiede lassen sich möglicherweise auf die Präparation von EF-G und die Durchführung des tryptischen Verdaus zurückführen.
EF-G (L.casei) zeichnet sich nicht nur durch ein erhöhtes Mole-

kulargewicht aus; auch im Verlauf der Trypsinolyse zeigt sich ein völlig verändertes Spaltmuster. Zudem verhält sich EF-G (L.casei) gegen den tryptischen Angriff wesentlich unempfindlicher. Die beiden größten Fragmente (84000, 78000) werden erst nach vierstündiger Inkubation weiter abgebaut. Dabei entstehen wiederum die 53000- und 24000-Fragmente.
EF-G (L.casei) ähnelt vom Molekulargewicht eher dem eukaryontischen EF-2. Das tryptische Spaltmuster beider Proteine zeigt zumindest in der großen Anzahl entstehender Fragmente eine gewisse Ähnlichkeit (NILSSON et al.,1985).

	E.coli[1]	E.coli[3]	L.casei[3]	Leber[2]
			92	92,5
			86	
			84 ▲	82
EF-G	81	80	78 ▲	
T_1	76	74	74	
			72	
		68	66	
		67 ▲		
		64		
		63 ▲		
			60	
T_2	56	56	56	
		51	53 ▲	
T_3	49	49	49	48
T_4	41	38 ▲		33,34
T_5	26		24 ▲	
T_6	6			
T_7	7,5			

Tabelle 10: Bei der Trypsinbehandlung von EF-G bzw. EF-2 auftretende Fragmente mit den zugehörigen Molekulargewichten (in Tausend).
(1): OVCHINIKOV et al.,1982; SKAR et al.,1975;
(2): NILSSON et al.,1985; (3): diese Arbeit
Die Hauptspaltprodukte sind besonders gekennzeichnet (▲).

EF-G benötigt zu seiner maximalen Aktivität in der Proteinbiosynthese freie Thiolgruppen. Nach der Sequenzanalyse besitzt EF-G (E.coli) drei freie Sulfhydrylgruppen, von denen zumindest eine essentiell für seine Funktion sein soll. SH-Gruppenreagenzien wie N-Ethylmaleimid (NEM) hemmen demnach die entkoppelte GTP-Hydrolyse und die Fähigkeit des Faktors mit Guaninnukleotiden und Ribosomen einen ternären Komplex zu bilden. Im ternären Komplex jedoch wird EF-G vor der Inaktivierung durch NEM geschützt.

ARAI et al.(1977a) beschreiben eine völlige Hemmung der entkoppelten GTPase und der ternären Komplexbildung in Abhängigkeit von NEM für den EF-G aus E.coli. Die Fähigkeit des Faktors aus Thermus thermophilus HB8 zur Katalyse diese Partialreaktionen wird durch NEM ebenfalls unterbunden (NAKAMURA et al.,1978). Dieser Effekt konnte jedoch nur bei einer Inkubationstemperatur von 60°C und relativ hohen Hemmstoff-Konzentrationen (bis 30mM) festgestellt werden. Bei 30°C erfolgt selbst bei längerer Inkubation unter den beschriebenen Bedingungen keine Inaktivierung. Nach Meinung der Autoren scheint die Sulfhydrylgruppe nicht für die Bindung der Guaninnukleotide sondern eher für die Interaktion mit dem Ribosom maßgeblich zu sein. Durch Photo-Affinitäts-Markierung zeigten GIRSHOVICH et al. (1978) die Beteiligung einer Sulfhydrylgruppe im aminoterminalen Bereich der Polypeptidkette an der Bindung von Guaninnukleotiden.

Die Mehrzahl der veröffentlichten Daten zeigt hingegen nur eine partielle Inaktivierung des Faktors durch Sulfhydryl-Inhibitoren. MARSH et al. (1975) konnten mit den beiden Thiolreagenzien 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoat) und p-Hydroxymercuribenzoat praktisch keinen Einfluß auf die Poly(Phe)-Synthese oder EF-G katalysierte Teilreaktionen feststellen.

Wie hier gezeigt, ergaben verschiedene Konzentrationen an NEM auf den Elongationsfaktor aus beiden Testorganismen keine Hemmung der Poly(U)-codierten Poly(Phe)-Synthese. Zumindest beim Faktor aus L.casei muß neben der Möglichkeit, daß eine vorhandene essentielle Sulfhydrylgruppe für den Inhibitor nicht zugänglich war, auch in Betracht gezogen werden, daß eine solche

nicht existiert. Der EF-Tu aus Thermus thermophilus enthält ebensowenig eine freie Sulfhydrylgruppe, so daß die Bindung des Guaninnukleotids hier anders als bei E.coli verlaufen muß (NAKAMURA et al.,1978).
GIRBES et al. (1976) fanden, daß NEM die Aktivität von EF-G in der Bildung des ternären Komplexes, der entkoppelten GTPase und der Poly(Phe)-Synthese nur unvollständig hemmt (10-70%). Durch Bindungsstudien mit $[^3H]$-N-Ethylmaleimid wollten sie zwei gegen NEM unterschiedlich sensitive G-Faktoren nachgewiesen haben.
Die Gründe für diese vielfältigen Ergebnisse sind bislang nicht bekannt. Die unvollständige Inaktivierung durch NEM kann darauf hinweisen, daß die Funktion der Sulfhydrylgruppe des EF-G für den Ablauf der Proteinbiosynthese zwar wesentlich, jedoch nicht essentiell ist. Es stellt sich auch die Frage, ob die Heterogenität von EF-G bezüglich der SH-Inhibitoren nicht einfach ein Ergebnis der Reinigungsprozedur ist, oder ob tatsächlich unterschiedlich reaktive Formen des Elongationsfaktors in der Zelle existieren.

Bisherige Untersuchungen des Elongationsfaktors Tu zeigten bei Vertretern der Milchsäurebakterien eine ausgeprägte Stabilität gegen Hitzebehandlung, die sich sowohl auf die Fähigkeit zur Poly(Phe)-Synthese als auch auf die GDP-Bindungsaktivität erstrecken kann (WÖRNER et al.,1983).
Auch EF-G aus L.casei besitzt eine verminderte Hitzeempfindlichkeit. Der Unterschied zu E.coli zeigt sich besonders deutlich in der Katalyse der entkoppelten GTPase-Reaktion. EF-G (L.casei) wird hier erst bei einer um 10°C höheren Inkubationstemperatur um die Hälfte inaktiviert.
Hitzeunempfindliche Proteine lassen sich v.a. aus thermophilen Mikroorganismen isolieren. So besitzt Thermus thermophilus HB8 einen EF-G, dessen Fähigkeit zur entkoppelten GTP-Hydrolyse erst nach Inkubation bei 85°C zur Hälfte vermindert wird. Diese Stabilität scheint durch eine kompakte Struktur und eine höhere Zahl hydrophober Wechselwirkungen in den Proteinen thermophiler Organismen zustande zu kommen (NAKAMURA et al., 1978).

Bei Milchsäurbakterien ist jedoch kein physiologischer Vorteil durch temperaturstabile Proteine erkennbar.

Mikroorganismen verfügen über verschiedene biochemische Mechanismen, die zu einer Antibiotika-Resistenz führen können. So kann das Antibiotikum nach Eindringen in den Zielorganismus enzymatisch inaktiviert werden. Als klassische Beispiele hierfür gelten die ß-Lactamasen und die enzymatische Modifikation von Aminoglykosiden durch Phosphorylierung, Adenylierung oder Acetylierung. Ferner kann eine verminderte Zellpermeabilität dafür sorgen, daß der Hemmstoff nicht an seinen Wirkort gelangt (Eindringungsresistenz) oder die Zelle besitzt gar einen veränderten Wirkort (Wirkortresistenz). Oftmals ergänzen sich auch mehrere dieser Möglichkeiten gegenseitig. Bei Produzentenstämmen von Antibiotika können weitere selektive Mechanismen vorliegen, die den Organismus gegen sein eigenes Antibiotikum schützen.

Das Vorliegen von Wirkortresistenzen wurde *in vitro* mittels der Poly(U)-abhängigen Poly(Phe)-Synthese untersucht. Das herausragende Ergebnis war hierbei, daß L.casei natürlich wirkortresistent gegen alle an den beiden löslichen Faktoren Tu und G angreifenden Antibiotika (Kirromycin, Pulvomycin, Fusidinsäure ist. Da mit dem Elongationsfaktor Tu aus L.brevis (WÖRNER,1982 und L.acidophilus (WASILIU,1983) schon zwei Vertreter der Milchsäurebakterien näher charakterisiert waren, wurde hier auf eine eingehendere Untersuchung der Kirromycin- und Pulvomycin-Resistenz verzichtet. Beide Antibiotika immitieren bei E.coli den EF-Ts-spezifischen Effekt, bei niederen Temperaturen EF-Tu-gebundenes GDP gegen freies GDP auszutauschen (CHINALI et al., 1977; BLUMENTHAL et al.,1977; WOLF et al.,1978). Kirromycin und in geringerem Maße Pulvomycin können bei E.coli die Rolle der physiologischen Effektoren ersetzen und so die EF-Tu-abhängige GTP-Hydrolyse stimulieren (WOLF et al.,1974).
Der Kirromycin- und Pulvomycin-resistente EF-Tu aus L.acidophilus erwies sich auch bei der Untersuchung dieser Partialreaktionen als unempfindlich (WASILIU,1983). Des weiteren konnte dort durch das säulenchromatographische Verfahren nach Hummel

und Dreyer eine Bindung der Antibiotika an EF-Tu ausgeschlossen werden.
Neben der bei Lactobacillen verbreiteten Resistenz gegen Kirromycin und Pulvomycin erwies sich auch der EF-Tu einer Reihe weiterer Organismen als natürlich wirkortresistent gegen Kirromycin. So besitzen die beiden Archaebakterien Halobacterium cutirubrum und Caldariella acidophila Kirromycin-unempfindliche Faktoren (KESSEL et al.,1981; CAMMARANO et al.,1982). Auch bei den Produzentenstämmen dieser Antibiotika tritt die Kirromycin-Resistenz häufiger auf. Streptoverticillium mobaraense,Streptomyces cinnamomeus und Streptomyces lactamdurans als Produzenten von Pulvomycin, Kirrothricin bzw. Efrotomycin erwiesen sich als wirkortresistent gegen Kirromycin (GLÖCKNER 1982; 1984). Kirromycin-resistente Mutanten sind auch E.coli beschrieben worden. In der Mutante D 2216 ist nach Inaktivierung des tufA-Gens ein verändertes tufB-Gen für die Resistenz verantwortlich (FISCHER et al.,1977). Beim Stamm LBE 2045 liegt ein modifiziertes tufA-Gen vor (VAN DE KLUNDERT et al., 1978). Bei beiden Mutanten scheint die Unempfindlichkeit gegen Kirromycin durch den Austausch von Alanin in Position 375 der Polypeptidkette zustande zu kommen.
Neben den Milchsäurebakterien ist eine Pulvomycin-Resistenz nur noch vom EF-Tu aus Caldariella acidophila bekannt. Gegen Pulvomycin resistente Mutanten sind nicht beschrieben.
L.casei ist bislang auch der einzige Organismus, von dem eine natürliche Wirkortresistenz gegen Fusidinsäure bekannt und näher charakterisiert ist. Selbst bei den höchsten eingesetzten Hemmstoffkonzentrationen konnte mit EF-G (L.casei) in der Poly(Phe)-Synthese keine Hemmung des Einbaus von [^{14}C]-Phe erreicht werden. Auch die durch EF-G katalysierten Partialreaktionen der Proteinbiosynthese zeigten keinen Einfluß durch steigende Mengen des Antibiotikums. Fusidinsäure hemmt die Bindung des ternären Komplexes EF-Tu·GTP·AA-tRNA an Ribosomen, indem es den {EF-G·GDP·Ribosomen}-Komplex stabilisiert. Mit dem resistenten Faktor aus L.casei konnte auch dieser Effekt nicht beobachtet werden. Die Hemmung der *in vitro*-Translation durch Fusidinsäure bei E.coli kann jedoch durch Zugabe von resistentem Faktor aufge-

hoben werden. EF-G·GTP (L.casei) verdrängt demnach den Komplex Fusidinsäure·EF-G·GDP (E.coli) aus seiner ribosomalen Bindungsstelle. Die Affinität des resistenten Faktors zum Ribosom liegt auch vergleichsweise höher als bei EF-Tu·GTP·AA-tRNA aus E.coli. Zudem läßt sich vermuten, daß auch der EF-G·GTP-Komplex relativ stabiler ist.
Eine Fusidinsäure-resistente Mutante von E.coli wurde von BERNARDI und LEDER (1970) beschrieben. Sensitiver und resistenter Faktor waren dort durch immunologische, chromatographische und elektrophoretische Methoden nicht zu unterscheiden. Die spezifische Aktivität des sensitiven EF-G war jedoch während der Reinigung doppelt so hoch als beim resistenten Elongationsfaktor der Fall. Zudem lag die Michaelis-Konstante für die ribosomenabhängige GTP-Hydrolyse beim resistenten G-Faktor höher. Die Wirkortresistenz gegen Fusidinsäure zeigte sich bei dieser Mutante in der Poly(Phe)-Synthese und der entkoppelten GTPase nur bei Hemmstoffkonzentrationen von 1µM bis 1mM. Bei der höchsten Konzentration an Fusidinsäure war die Poly(Phe)-Synthese mit resistentem Faktor vollständig und die GTP-Hydrolyse zu 80% gehemmt. Der EF-G aus L.casei erwies sich in dieser Hinsicht als bedeutend unempfindlicher. Eine weitere Fusidinsäure-resistente Mutante wurde von KINOSHITA et al. (1968) beschrieben. TOCCINI-VALENTINI et al. (1968) konnten eine temperatursensitive Form des Elongationsfaktors G aus E.coli isolieren.

Kirromycin induziert beim EF-Tu (E.coli) stets die Konformation, die derjenigen von EF-Tu·GTP entspricht. Damit wird die Ablösung des Elongationsfaktors vom Ribosom verhindert. Die beiden Guaninnukleotide GDP und GTP regulieren auch die Affinität von EF-G zur gemeinsamen ribosomalen Bindungsstelle (SPIRIN,1986). Es liegt daher nahe zu vermuten, daß Fusidinsäure auf EF-G·GDP einen entsprechenden Effekt ausübt, wie bei Kirromycin und EF-Tu·GDP beschrieben. Angaben über unterschiedliche Konformationen von EF-G im Komplex mit GTP bzw. GDP und den Einfluß von Fusidinsäure hierauf liegen aber nicht vor.

Bei der für L.casei im Verdünnungsreihentest festgestellten Resistenz gegen Aminoglykoside (Gentamycin, Kanamycin, Neomycin, Streptomycin) konnte nicht entschieden werden, ob eine Eindringungsresistenz vorliegt oder ob die Hemmstoffe, wie bei Aminoglykosiden weit verbreitet, enzymatisch inaktiviert werden (GALE et al.,1981). Bei der Poly(Phe)-Synthese erwiesen sich die 70S Ribosomen aus L.casei hingegen als eindeutig wirkortresistent gegen Tobramycin.
Tobramycin wurde erstmals 1967 aus dem Kulturfiltrat von Streptomyces tenebrarius gewonnen und induziert wie alle Aminoglykoside verstärktes misreading in der Proteinbiosynthese (VAZQUEZ,1979). Der eigentliche Effekt von Aminoglykosiden scheint jedoch eine Hemmung der Translokation zu sein (CABANAS et al.,1978). Tobramycin, das an die 30S Untereinheit des Ribosoms bindet, hat v.a. zur Behandlung von Pseudomonas aeruginosa-Infektionen klinische Bedeutung erlangt. Die übrigen Aminoglykoside mit einem 2-Deoxystreptamin-Anteil zeigen (mit Ausnahme von Neomycin) in der *in vitro*-Translation den für sie charakteristischen dreiphasigen Kurvenverlauf, der auf mehrere ribosomale Bindungsstellen für den jeweiligen Hemmstoff hindeutet (ZIERHUT et al.,1979).
Im Unterschied zu anderen Aminoglykosiden verursacht Spectinomycin kein misreading in der Proteinbiosynthese (ANDERSON et al.,1967). Die hemmende Wirkung kommt vermutlich ebenfalls durch einen Eingriff in die Translokation zustande. Spectinomycin bindet an die kleine ribosomale Untereinheit, besitzt aber offensichtlich nur eine Bindungsstelle. Im zellfreien System und unter Beteiligung einer synthetischen mRNA hängt der inhibierende Effekt entscheidend von der Nukleotidzusammensetzung der Matrize ab. Nur mit Poly(C) oder steigendem Guanin- und Cytosin-Gehalt der mRNA wird die *in vitro*-Translation bei E.coli gehemmt. Eine mögliche Erklärung für diese Spezifität wäre eine Bindung des Antibiotikums an G/C-reiche Codon-Anticodon Paare, die nicht unbedingt im A-Site-Bereich ablaufen muß. Ribosomen aus L.casei zeigten mit Spectinomycin dagegen keine oder zumindest unterschiedliche Matrizen-Spezifität.

So ergibt sich mit Poly(U) eine deutliche Hemmung der Poly-(Phe)-Synthese, wenn auch der ID_{50}-Wert mit 300µM relativ hoch liegt. Mit Ribosomen (E.coli) und einer natürlichen Matrize liegt dieser Wert unter 1µM Spectinomycin. Unklar ist hier aber auch, warum die Einbaurate der markierten Aminosäuren bei höheren Antibiotika-Konzentrationen nicht unter 30-50% des ursprünglichen Wertes sinkt (ANDERSON et al.,1977).

Beide Testorganismen zeigten *in vivo* eine Eindringungsresistenz gegen Thiostrepton und Viomycin.

Über die eigentliche Funktion von EF-G im Elongationscyclus besteht nach wie vor Unklarheit. Die ursprüngliche Annahme einer direkten Verbindung zwischen GTP-Hydrolyse und Translokation im Sinne eines mechanochemischen Systems konnte durch Versuche mit nichthydrolysierbaren GTP-Analogen widerlegt werden. So findet auch mit EF-G und GMP-PCP oder GMP-PNP und Ribosomen im Pretranslokations-Zustand eine rasche Translokation statt. Zudem erfolgt die Spaltung von GTP erst nach erfolgter Translokation; der Phosphatrest wird direkt auf ein Wasser-Molekül übertragen, ohne daß ein phosphoryliertes Zwischenprodukt gebildet wird, das für eine energetische Kopplung verantwortlich wäre. Die nichtenzymatische Translokation ohne EF-G und GTP zeigt, daß diese Reaktion thermodynamisch erlaubt ist und keiner weiteren Energie bedarf.
EF-G und GTP katalysieren zwar die Translokation, dies ist aber primär nur eine Folge der Bindung von EF-G·GTP an das Ribosom und nicht der durch GTP-Hydrolyse freigesetzten Energie. Beide Guaninnukleotide regulieren folglich nur die Aktivität von EF-G im Elongationscyclus.

Proteine die Guaninnukleotide binden (sog. G-Proteine) finden sich nicht nur in der Proteinbiosynthese, sondern auch in weiteren wichtigen regulatorischen Positionen bei Pro- und Eukaryonten (HUGHES,1983).
G-Proteine modulieren die Aktivität der Adenylatcyclase bei der Hormonwirkung (CASSEL et al.,1977) und der cyclischen

GMP-Phosphodiesterase beim Sehvorgang (STRYER et al.,1981). Das Tubulin des Cytoskeletts besitzt GTPase-Aktivität (CARLIER,1982) und auch eine Reihe von Onkogen-Produkten (p21) binden spezifisch Guaninnukleotide (SCOLNICK et al.,1979). All diese G-Proteine dienen regulatorischen Zwecken und zeigen hierbei ein identisches Reaktionsmuster. Die Bindung von GTP verändert die Konformation des G-Proteins derart, daß es an weitere Makromoleküle binden kann. Die Hydrolyse von GTP senkt die Affinität des G-Proteins zu seinem Bindungspartner und es wird im Komplex mit nichtkovalent gebundenem GDP freigesetzt. Durch diese kontrollierten Wechselwirkungen erfüllt das G-Protein seine regulatorische Funktion. Der Reaktionsablauf gilt auch für die GTP-bindenden Proteine der Proteinbiosynthese.

Welche Funktion fällt nun EF-G zu und was sind hierbei seine Reaktionspartner? EF-G·GTP bindet zunächst an das Ribosom. Diese Interaktion kann nun direkt zu einem Wechsel der tRNA-Moleküle auf ihren ribosomalen Bindungsstellen führen oder es werden durch indirekte Konformationsänderungen am Ribosom die strukturellen Voraussetzungen geschaffen, durch die sterische und energetische Barrieren überwunden werden und eine spontane Translokation erlauben. Das gebundene Guaninnukleotid bestimmt bei IF-2 und EF-Tu darüberhinaus auch noch die Affinität zu fMet-$tRNA_f^{Met}$ und AA-tRNA. Nicht nur die Gemeinsamkeiten im Reaktionsmuster, sondern auch offensichtliche Strukturhomologien zwischen diesen Proteinsynthesefaktoren (LAURSEN et al.,1981; OVCHINIKOV et al.,1982; SACERDOT et al., 1984) lassen die Möglichkeit zu, daß auch EF-G während der Translokation mit deacylierter tRNA eine Wechselwirkung eingeht. So wie IF-2 und EF-Tu dazu dienen beladene tRNA zum Ribosom zu transportieren könnte EF-G die Aufgabe übernehmen die deacylierte tRNA von der ribosomalen P-Site zu entfernen. Zu diesem Zweck wurden Versuche unternommen eine direkte Wechselwirkung zwischen EF-G (L.casei) und tRNA nachzuweisen. Der Trypsinverdau von EF-G (L.casei) in Gegenwart von tRNA zeigte in der gelelektrophoretischen Analyse ein deutlich verändertes Spaltmuster bezüglich der Kinetik des proteolytischen

Abbaus und der Mengenverhältnisse der dabei auftretenden Bruch
stücke. Die Dichtegradientenzentrifugation ergab bei Anwesen-
heit des jeweiligen Partners Elutionsprofile von EF-G und tRNA
bei denen die Aktivitäten zu höheren Molekulargewichten ver-
schoben waren. Dieses Ergebnis ließ sich zwar mehrfach wieder-
holen, doch ergaben sich bisweilen auch gegenteilige Resultate
Beides sind jedoch ernstzunehmende Hinweise, daß eine solche
Wechselwirkung tatsächlich besteht. Es ist zudem denkbar, daß
für eine derartige Interaktion das Ribosom als weiterer Bin-
dungspartner benötigt wird.
Weitere, nicht gezeigte Versuche, eine Bindung von tRNA an EF-
nachzuweisen (Fluoreszenzmarkierung von tRNA nach YANG et al.
1974; Gleichgewichtszentrifugation in der Airfuge nach POLLET
et al.,1979; Gelfiltration von EF-G und tRNA an Sephadex G 100
und mittels FPLC), ergaben keine befriedigenden Resultate. Zur
weiteren Klärung dieser Hypothese sind andere einfache und re-
produzierbare Testsysteme nötig.
Auch die Beteiligung von EF-G in der Termination der Protein-
biosynthese könnte auf eine solche Wechselwirkung hindeuten.
Erscheint ein Terminationscodon in der ribosomalen A-Site, so
binden RF-1 (oder RF-2), RF-3 und GTP an das Ribosom. Die
Peptidyltransferase katalysiert daraufhin die Freisetzung der
Polypeptidkette, GTP wird hydrolysiert, und die Terminations-
faktoren verlassen das Ribosom (SPIRIN,1986). Der verbleiben-
de {Ribosomen·mRNA}-Komplex trägt nun einzig eine deacylierte
tRNA in der P-Site. Um diese freizusetzen und das Ribosom von
der Matrize abzulösen, bedarf es eines Ribosomen-releasing-
Faktors, EF-G und GTP (HIRASHIMA et al.,1972; 1972a; 1973).
Die naheliegendste Annahme wäre, daß EF-G auch hier für die
Freisetzung der tRNA sorgt.
Eine bislang nicht geklärte Funktion erfüllt EF-G auch im
Stoffwechsel von Guanosinpolyphosphaten. Der als stringent
control bezeichnete Mechanismus kontrolliert bei E.coli die
Syntheserate von RNA. Eine Erhöhung der intrazellulären Menge
an deacylierter tRNA führt bei einem stringent-Phänotyp zur
Hemmung der Synthese von RNA, ribosomalen Proteinen, Trans-
lationsfaktoren und der α-Untereinheit der RNA-Polymerase.

Verantwortlich dafür ist das Gen relA, das für eine ribosomengebundene Nukleotidphosphotransferase codiert. Die gebildeten Guanosinnukleotide ppGpp und pppGpp beeinflußen die Aktivität der RNA-Polymerase. EF-G kann *in vitro* pppGpp hydrolysieren. Bei nichtpermissiven Temperaturen wurde mit einem temperatursensitiven EF-G in einem $relA^+$-Stamm von E.coli die Synthese von ppGpp um die Hälfte verringert. Außerdem verhindert Fusidinsäure die Bildung dieses Guaninnukleotids während der Hitzebehandlung. Welche Funktion EF-G in diesem Kontrollmechanismus erfüllt, ist nicht bekannt. Es mag bedeutsam erscheinen, daß das auslösende Signal für den stringent control ein Anstieg an deacylierter tRNA ist (PAO et al.,1981).

Neuere Ribosomen-Modelle (RHEINBERGER et al.,1983; 1983a) postulieren drei tRNA-Bindungsstellen, wobei die dritte E-Site spezifisch deacylierte tRNA binden soll (KIRILLOV et al.,1985; MAKAROV et al.,1985). Zudem soll das Ribosom im Pre- und Posttranslokations-Zustand zwei tRNA-Moleküle gebunden haben, was nach dem ursprünglichen Vorstellungen vom Ablauf der Proteinbiosynthese nicht möglich ist. Die E-Site soll sich in Nachbarschaft zur P-Site in Richtung des 5'-Endes der mRNA befinden. Deacylierte tRNA wird bei der Translokation nicht freigesetzt, sondern wechselt auf die E-Site, die sie erst nach Bindung der nächsten Aminoacyl-tRNA verläßt. Widersprüchliche Auffassungen bestehen darüber, ob die tRNA in der E-Site codonspezifisch gebunden wird (GRAJEVSKAJA et al.,1982). Diese Vorstellungen widersprechen jedoch der Annahme, daß EF-G die Freisetzung von deacylierter tRNA katalysiert. So ist es nicht verwunderlich, daß dieses Ribosomen-Modell nicht allgemein anerkannt ist (SPIRIN,1984).

In den letzten Jahren konnten die Primärstrukturen der wichtigsten, in der Proteinbiosynthese beteiligten Faktoren aufgeklärt werden. Dabei traten beachtliche Homologien zwischen den Elongationsfaktoren EF-G, EF-Tu und dem Initiationsfaktor IF-2 zutage. So zeigen Bereiche der Polypeptidkette, die die GTP-Bindungsstelle enthalten, zwischen EF-G und EF-Tu Übereinstimmungen

von 37-58%, abhängig davon, ob man exakte Homologien oder konservative Substitutionen betrachtet (HALLIDAY,1983).
Diese Homologien bilden einen Hinweis, daß sich die Gene der Proteinsynthese-Faktoren zumindest teilweise aus einem gemeinsamen Vorläufer herausgebildet haben. Entsprechende Übereinstimmungen finden sich auch beim Vergleich mit weiteren G-Proteinen.

Nach der (nicht unumstrittenen) Onkogen-Theorie codieren Proto-Onkogene für solche Proteine, die an der Regulation wichtiger zellulärer Funktionen beteiligt sind. Veränderungen in der Sequenz oder Expression dieser Proto-Onkogene könnten zu einer malignen Transformation beitragen (BISHOP,1983; DUESBERG et al.,1985). Die menschlichen ras-Gene codieren allesamt für Proteine mit einem Molekulargewicht von 21000, die demzufolge als p21 bezeichnet werden. p21-Proteine sind an der Innenseite der Cytoplasmamembran lokalisiert und ihre einzige bekannte biochemische Funktion war bislang die Bindung von GDP/GTP sowie die Fähigkeit zur GTP-Hydrolyse. Neuere Ergebnisse zeigen, daß p21 an den Transferrin-Rezeptor binden kann (COOPER,1985). Mutierte, onkogene Formen von p21 zeigen einen charakteristischen Aminosäure-Austausch in den Positionen 12 bzw. 61 der Polypeptidkette. Veränderungen an diesen Positionen reichen aus, um p21 mit der Fähigkeit zur Transformation auszustatten (McCORMICK et al,1985). Von diesen Mutationen ist v.a. der GTP-Bindungsbereich betroffen, und die onkogene Form weist eine deutlich reduzierte GTPase-Aktivität auf (FERAMISCO et al., 1985). Nach dem allgemeinen Reaktionsmuster der G-Proteine würde dies bedeuten, daß p21 nun vornehmlich in der 'reaktiven' Form vorliegt. Dies könnte auf noch unbekannte Weise zur Transformation der betroffenen Zelle führen.
Die Sequenzhomologie zwischen EF-Tu und p21 beträgt ca. 50%. Hiervon scheint vornehmlich die Bindungsstelle der Guaninnukleotide betroffen zu sein. Es wird vermutet, daß ebenso die Sekundärstruktur dieser Bereiche ähnlich gestaltet ist (HALLIDAY,1983; LEBERMAN et al.,1984; JURNAK,1985; BOURNE,1986).

Falls eine erniedrigte GTPase-Aktivität bei der onkogenen Form von p21 tatsächlich für die Zelltransformation verantwortlich sein sollte, so erscheint es äußerst vielversprechend, die Wirkung solcher Antibiotika auf p21 und seine onkogenen Formen zu untersuchen, die im Falle der Elongationsfaktoren zu einer unterschiedlich reaktiven Konformation führen. Möglicherweise kann auf diesem Weg auch die schon länger bekannte cytostatische Wirkung von Pulvomycin auf transformierte Zellen einer Lösung näher gebracht werden (AKITA et al.,1963).

V. ZUSAMMENFASSUNG

Der Proteinbiosynthese-Apparat von L.casei wurde hinsichtlich seiner strukturellen und funktionellen Eigenschaften und der Empfindlichkeit gegen Antibiotika untersucht und mit E.coli verglichen.
70S Ribosomen wurden durch Ultrazentrifugation isoliert. Das Proteinmuster der zweidimensionalen Gelelektrophorese beider Organismen weist deutliche Unterschiede auf.
Die Reinigung der Elongationsfaktoren erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie, hydrophobe Chromatographie und Gelfiltration. Alle Elongationsfaktoren aus L.casei zeigten in der gelelektrophoretischen Analyse ein erhöhtes Molekulargewicht. Der isoelektrische Punkt von EF-G (L.casei) lag bei 4,7. Während des proteolytischen Abbaus mit Trypsin zeigt EF-G (L.casei) nicht nur ein verändertes Spaltmuster, sondern verhält sich auch wesentlich unempfindlicher. Das deutet auf eine kompakte Struktur dieses Elongationsfaktors hin.
Die Poly(U)-codierte Poly(Phe)-Synthese konnte durch NEM-Behandlung von EF-G nicht beeinflußt werden. Möglicherweise besitzt EF-G (L.casei) keine für seine Funktion unentbehrliche Sulfhydrylgruppe. Vor allem in der Katalyse der entkoppelten GTP-Hydrolyse erwies sich EF-G (L.casei) unempfindlicher gegen Hitzebehandlung.
Die Untersuchung der Sensitivität gegenüber im Elongationscyclus angreifenden Antibiotika ergab für die Elongationsfaktoren aus L.casei eine natürliche Wirkortresistenz gegen Fusidinsäure,Kirromycin und Pulvomycin. Fusidinsäure hatte bei L.casei auf keine der untersuchten Partialreaktionen einen Einfluß. Dieser Elongationsfaktor besitzt eine hohe Affinität zu seiner ribosomalen Bindungsstelle. Es ist anzunehmen, daß auch der EF-G·GTP-Komplex vergleichsweise stabiler ist.
Die 70S Ribosomen dieses Milchsäurebakteriums wiesen eine Wirkortresistenz gegen Tobramycin, sowie eine veränderte Matrizenabhängigkeit bei der Wirkung von Spectinomycin auf.

Durch proteolytischen Verdau und Sucrose-Dichtegradienten-zentrifugation konnte eine direkte Wechselwirkung zwischen EF-G (L.casei) und tRNA nachgewiesen werden. Dies erlaubt Rückschlüsse auf die Funktion von EF-G und den Ablauf der Translokation. In Anlehnung an die Funktionen von EF-Tu und IF-2 kann EF-G im Verlauf der Translokation die deacylierte tRNA durch direkte Wechselwirkung von der ribosomalen P-Site entfernen.
Neuere Ergebnisse zu Struktur und Funktion von Onkogen-Produkten wurden diskutiert und lassen eine Aufklärung der Pulvomycin-Wirkung auf Tumorzellen möglich erscheinen.

VI. L I T E R A T U R

AKITA, E., K. MAEDA, H. UMEZAWA: Isolation and characterization of labilomycin, a new antibiotic.
J. Antibiotics 16, 147-151 (1963)

ALAKHOV, Y.B., O.A. STENGREVICS, V.V. FILIMINOV, S.Y. VENYAMINOV: Cleavage of elongation factor G into compact domains.
Eur. J. Biochem. 99, 585-591 (1979)

AMILS, R., E.A. MATTHEWS, C.R. CANTOR: Reconstitution of 50S ribosomal subunits from Escherichia coli.
In: Methods in enzymology. Moldave, K., Grossman, L. (eds.), Vol. VIX, S. 449-461. New York: Academic Press Inc. 1979

ANDERSON, P., J. DAVIES, B.D. DAVIS: Effect of spectinomycin on polypeptide synthesis in extracts of Escherichia coli.
J. Mol. Biol. 29, 203-215 (1967)

ARAI, K.-I., T. ARAI, M. KAWAKITA, Y. KAZIRO: Conformational transitions of polypeptide chain elongation factor Tu
I. Studies with hydrophobic probes.
J. Biochem. 77, 1095-1106 (1975)

ARAI, K.-I., T. MAEDA, M. KAWAKITA, S. OHNISHI, Y. KAZIRO: Conformational transitions of polypeptide chain elongation factor Tu II. Further studies by electron spin resonance.
J. Biochem. 80, 1047-1055 (1976)

ARAI, K.-I., T. ARAI, M. KAWAKITA, Y. KAZIRO: Further studies on the properties of the polypeptide chain elongation factors Tu and Ts: Hydrogen-Tritium exchange, optical rotatory dispersion and intrinsic fluorescence.
J. Biochem. 81, 1335-1346 (1977)

ARAI, N., K.-I. ARAI, S. NAKAMURA, Y. KAZIRO: Properties and function of the sulfhydryl group in the polypeptide chain elongation factor G from E.coli.
J. Biochem. 82, 695-702 (1977a)

ARAI, K.-I., O. YOSHIMI, N. ARAI, S. NAKAMURA, C. HENNEKE, T. OSHIMA, Y. KAZIRO: Studies on polypeptide chain elongation factors from an extreme thermophile, Thermus thermophilus HB8 I. Purification and some properties of the purified factors.
Eur. J. Biochem. 92, 509-519 (1978)

ARAI, K.-I., B.F.C. CLARK, L. DUFFY, M.D. JONES, Y. KAZIRO, R.A. LAURSEN, J. L'ITALIEN, D.L. MILLER, S. NAGARKATTI, S. NAKAMURA, K.M. NIELSEN, T.E. PETERSEN, K. TAKAHASHI, M. WADE: Primary structure of elongation factor Tu from Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1326-1330 (1980)

ASSMANN, D., H. WOLF: Pulvomycin, an inhibitor of procaryotic protein biosynthesis. Arch. Microbiol. 120, 297-299 (1979)

BELITSINA, N.V., M.A. GLUKHOVA, A.S. SPIRIN: Translocation in ribosomes by attachment-detachment of elongation factor G without GTP cleavage: evidence from a column-bound ribosome system. FEBS Lett. 54, 35-38 (1975)

BELITSINA, N.V., A.S. SPIRIN: Ribosomal translocation assayed by the matrix-bound Poly(uridylic acid) column technique; Effect of different magnesium concentrations. Eur. J. Biochem. 94, 315-320 (1979)

BERNARDI, A., P. LEDER: Protein biosynthesis in Escherichia coli. Purification and characteristics of a mutant G-factor.
J. Biol. Chem. 245, 4263-4268 (1970)

BISHOP, J.M.: Cellular oncogenes and retroviruses. Ann. Rev. Biochem. 52, 301-354 (1983)

BLUMENTHAL, T., J. DOUGLAS, D. SMITH: Conformational alteration of protein synthesis elongation factor EF-Tu by EF-Ts and by kirromycin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3264-3267 (1977)

BODLEY, J.W., F.J. ZIEVE, L. LIN, S.T. ZIEVE: Formation of the ribosome-G factor-GDP complex in the presence of fusidic acid. Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 437-443 (1969)

BODLEY,J.W., F.J. ZIEVE, L. LIN: Studies on translocation IV. The hydrolysis of a single round of GTP in the presence of fusidic acid. J. Biol. Chem. 245, 5662-5667 (1970)

BOURNE, H.R.: One molecular machine can transduce diverse signals. Nature 321, 814-816 (1986)

CABANAS, M.J., D. VAZQUEZ, J. MODOLELL: Dual interference of hygromycin B with ribosomal translocation and with aminoacyl-tRNA recognition. Eur. J. Biochem. 87, 21-28 (1978)

CAMMARANO, P., A. TEICHNER, G. CHINALI, P. LONDEI, M. DE ROSA, A. GAMBACORTA, B. NICOLAUS: Archaebacterial elongation factor Tu insensitive to pulvomycin and kirromycin. FEBS Lett. 148, 255-259 (1982)

CAMMARANO, P., A. TEICHNER, P. LONDEI, M. ACCA, B. NICOLAUS, J.L. SANZ, R. AMILS: Insensitivity of archaebacterial ribosomes to protein synthesis inhibitors. Evolutionary implications. EMBO J. 4, 811-816 (1985)

CARLIER, M.-F.: Guanosine-5'-triphosphate hydrolysis and tubulin polymerization. Mol. Cell. Biochem. 47, 97-113 (1982)

CELMA, M.L., D. VAZQUEZ, J. MODOLELL: Failure of fusidic acid and siomycin to block ribosomes in the pretranslocated state. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 1240-1246 (1972)

CHAU, V., G. ROMERO, R.L. BILTONEN: Kinetic studies on the interactions of Escherichia coli K 12 elongation factor Tu with GDP and elongation factor Ts. J. Biol. Chem. 256, 5591-5596 (1981)

CHINALI, G., H. WOLF, A. PARMEGGIANI: Effect of kirromycin on elongation factor Tu. Location of the catalytic center for ribosome·elongation factor Tu GTPase activity on the elongation factor. Eur. J. Biochem. 75, 55-65 (1977)

COOPER, G.M.: Structure and function of ras and blym oncogenes. Mod. Trends Hum. Leuk. VI, 273-276 (1985)

CRANE, L.J., D.L. MILLER: Guanosine triphosphate and guanosine diphosphate as conformation-determining molecules. Differential interaction of a fluorescent probe with the guanosine nucleotide complexes of bacterial elongation factor Tu. Biochem. 13, 933-939 (1974)

CUNDLIFFE, E.: The mode of action of fusidic acid. Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 1794-1801 (1972)

DE MAN, J.C., M. ROGOSA, M. SHARPE: A medium for the cultivation of Lactobacilli. J. Appl. Bact. 23, 130-132 (1960)

DUESBERG, P.H., M. NUNN, N. KAN, D. WATSON, P.H. SEEBURG, T. PAPAS: Are activated proto-onc genes cancer genes? Mod. Trends Hum. Leuk. VI, 9-27 (1985)

ERBE, R.W., P. LEDER: Initiation and protein synthesis. Translation of di- and tri-codon messengers. Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 798-803 (1968)

ERTEL, R., B. REDFIELD, N. BROT, H. WEISSBACH: Role of GTP in protein synthesis. Interaction of GTP with soluble transfer factors from E.coli. Arch. Biochem. Biophys. 128, 331-338 (1968)

ERTEL, R., N. BROT, B. REDFIELD, J.E. ALLENDE, H. WEISSBACH: Binding of guanosine 5'-triphosphate by soluble factors required for polypeptide synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59, 861-868 (1968a)

FAIRBANKS, G., T.C. STECK, D.F.H. WALLACH: Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochem. 10, 2606-2617 (1971)

FERAMISCO, J.R., R. CLARK, G. WONG, N. ARNHEIM, R. MILLEY, F. McCORMICK: Transient reversion of ras oncogene-induced cell transformation by antibodies specific for amino acid 12 of ras protein. Nature 314, 639-642 (1985)

FISCHER, E., H. WOLF, K. HANTKE, A. PARMEGGIANI: Elongation factor Tu resistant to kirromycin in an Escherichia coli mutant altered in both tuf genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4341-4345 (1977)

FURANO, A.V.: Content of elongation factor Tu in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 4780-4784 (1975)

GALE, E.F., E. CUNDLIFFE, P.E. REYNOLDS, M.H. RICHMOND, M.J. WARING: The molecular basis of antibiotic action. London: John Wiley & Sons 2. Aufl., 1981

GAVRILOVA, L.P., O.E. KOSTIASHKINA, V.E. KOTELIANSKY, N.M. RUTKEVITCH, A.S. SPIRIN: Factor-free (non-enzymic) and factor-dependent systems of translation of polyuridylic acid by Escherichia coli ribosomes. J. Mol. Biol. 101, 537-552 (1976)

GEISSER, M., G.W. TISCHENDORF, G. STÖFFLER, H.G. WITTMANN: Immunological and electrophoretical comparison of ribosomal proteins from eight species belonging to Enterobacteriaceae. Molec. Gen. Genet. 127, 111-128 (1973)

GEISSER, M., G.W. TISCHENDORF, G. STÖFFLER: Comparative immunological and electrophoretic studies on ribosomal proteins of Bacillaceae. Mole. Gen. Genet. 127, 129-145 (1973a)

GIRBES, T., D. VAZQUEZ, J. MODOLELL: A form of elongation factor G insensitive to N-Ethyl-maleimide. Mol. Biol. Rep. 2, 401-406 (1976)

GIRSHOVICH, A.S., E.S. BOCHAREVA, V.A. POZDNYAKOV, Y.A. OVCHINIKOV: The GTP-binding center of elongation factor G is located in its N-terminal domain. FEBS Lett. 85, 283-286 (1978)

GIRSHOVICH, A.S., T.V. KURTSKHALIA, Y.A. OVCHINIKOV, V.D. VASILIEV: Localization of the elongation factor G on Escherichia coli ribosomes. FEBS Lett. 130, 54-59 (1981)

GIRSHOVICH, A.S., E.S. BOCHKAREVA, Y.A. OVCHINIKOV: Elongation factor G and protein S 12 are nearest neighbours in the Escherichia coli ribosome. J. Mol. Biol. 151, 229-243 (1981a)

GIRSHOVICH, A.S., E.S. BOCHKAREVA, A.T. GUDKOV: Specific interaction of the elongation factor EF-G with ribosomal 23S RNA from Escherichia coli. FEBS Lett. 150, 99-102 (1982)

GLÖCKNER, C., W. WÖRNER, H. WOLF: Kirromycin-resistant elongation factor Tu from pulvomycin-producing wild-type of Streptoverticillium mobaraense. Biochem. Biophys. Res. Commun. 107, 959-965 (1982)

GLÖCKNER, C., H. WOLF: Mechanism of natural resitance to kirromycin-type antibiotics in Actinomycetes. FEMS Microbiol. Lett. 25, 121-124 (1984)

GLÖCKNER, C.: Kirromycinresistente Elongationsfaktoren Tu aus Produzentenstämmen von Antibiotika der Kirromycingruppe - Vergleichende Untersuchungen zu Struktur und Funktion. Dissertation, Univ. Tübingen (1985)

GODTFREDSEN, W.O., S.JAHNSEN, H. LORCK, K. ROHOLT, L. TYBRING: Fusidic acid, a new antibiotic. Nature 193, 987 (1962)

GRAJEVSKAJA, R.A., Y.V. IVANOV, E.M. SAMINSKY: 70S ribosomes of Escherichia coli have an additional site for deacylated tRNA binding. Eur. J. Biochem. 128, 47-52 (1982)

GRUNBERG-MANAGO, M.: Initiation of protein biosynthesis as seen in 1979. In: Ribosomes: Structure, function and genetics. (G. Chambliss, G.R. Craven, J. Davies, K. Davis, L. Kahan, M. Nomura, eds.), Baltimore, University Park Press (1980)

GUPTA, S.L., J. WATERSON, M.L. SOPORI, S.M. WEISMAN, P. LENGYEL: Movement of the ribosome along the messenger ribonucleic acid during protein biosynthesis. Biochem. 10, 4410-4421 (1971)

HACHMANN, J., D.L. MILLER, H. WEISSBACH: Purification of factor Ts: Studies on the formation and stability of nucleotide complexes containing transfer factor Tu. Arch. Biochem. Biophys. 147, 457-466 (1971)

HAENNI, A.L., J. LUCAS-LENARD: Stepwise synthesis of a tripeptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 61, 1363-1369 (1968)

HALLIDAY, K.R.: Regional homology in GTP-binding proto-oncogene products and elongation factors. J. Cycl. Nucl. Prot. Phos. Res. 9, 435-448 (1983)

HAMEL, E., M. KOKA, T. NAKAMOTO: Requirement of an E.coli 50S ribosomal protein component for effective interaction of the ribosome with T and G factors and with guanosine triphosphate. J. Biol. Chem. 247, 805-814 (1972)

HARDY, S.J.S., C.G. KURLAND, P. VOYNOW, G. MORA: The ribosomal proteins of Escherichia coli I. Purification of the 30S ribosomal proteins. Biochem. 8, 2897-2905 (1969)

HARRIS, R.J., S. PESTKA: Peptide bond formation. In: Molecular mechanisms of protein biosynthesis (H. Weissbach, S.Pestka eds.), New York, Academic Press (1977)

HIGHLAND, J.J., J.W. BODLEY, J. GORDON, R. HASENBANK, G. STÖFFLER: Identity of the ribosomal proteins involved in the interaction with elongation factor G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 142-150 (1973)

HIGO, K., W. HELD, L. KAHAN, M. NOMURA: Functional correspondence between 30S ribosomal proteins of Escherichia coli and Bacillus stearothermophilus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 944-948 (1973)

HIRASHIMA, A., A. KAJI: Purification and properties of ribosome-releasing factor. Biochem. 11, 4037-4044 (1972)

HIRASHIMA, A., A. KAJI: Factor dependent release of ribosomes from messenger RNA. Requirement for two heat-stable factors. J. Mol. Biol. 65, 43-58 (1972a)

HIRASHIMA, A., A. KAJI: Role of elongation factor G and a protein factor on the release of ribosomes from messenger ribonucleic acid. J. Biol. Chem. 248, 7580-7587 (1973)

HORI, H., S. OSAWA: Evolution of ribosomal proteins in Enterobacteriaceae. J. Bact. 133, 1089-1095 (1978)

HUGHES, S.M.: Are guanine nucleotide-binding proteins a distinct class of regulatory proteins? FEBS Lett. 164, 1-8 (1983)

INOUE-YOKOSAWA, N., C. ISHIKAWA, Y. KAZIRO: The role of guanosine triphosphate in translocation catalyzed by elongation factor G. J, Biol. Chem. 249, 115-118 (1974)

ISONO, K.: Genetics of ribosomal proteins and their modifying

and processing enzymes in Escherichia coli. In: Ribosomes: Structure, function and genetics. (G. Chambliss, G.R. Craven, J. Davies, K. Davis, L. Kahan, M. Nomura, eds.), Baltimore, University Park Press (1980)

JACOBSON, G.R., J.P. ROSENBUSCH: Abundance and membrane association of elongation factor Tu in E.coli. Nature 261, 23-26 (1976)

JELENC, P.C.: Rapid purification of highly active ribosomes from Escherichia coli. Anal. Biochem. 105, 369-374 (1980)

JURNAK, F.: Structure of the GDP-domain of EF-Tu and location of amino acids homologous to ras oncogene proteins. Science 230, 32-36 (1985)

KAJI, A., K.IGARASHI, H. ISHITSUKA: Interaction of tRNA with ribosomes. Binding and release of tRNA. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 34, 167-177 (1969)

KALTSCHMIDT, E., H.G. WITTMANN: Ribosomal proteins VII. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins. Anal. Biochem. 36, 401-412 (1970)

KALTSCHMIDT, E., H.G. WITTMANN: Ribosomal proteins XII. Number of proteins in small and large ribosomal subunits of Escherichia coli as determined by two-dimensional gel electrophoresis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 1276-1282 (1970a)

KAVANAGH, F.: Analytical microbiology. New York: Academic Press Inc. 1963

KAZIRO, Y.: The role of guanosine 5'-triphosphate in polypeptide chain elongation. Biochem. Biophys. Acta 505, 95-127 (1978)

KESSEL, M., F. KLINK: Two elongation factors from the extremly

halophilic archaebacterium Halobacterium cuturubrum. Assay systems and purification at high salt concentrations. Eur. J. Biochem. 114, 481-486 (1981)

KINOSHITA, T., G. KAWANO, N. TANAKA: Association of fusidic acid sensitivity with G factor in a protein-synthesizing system. Biochem. Biophys. Res. Commun. 33, 769-773 (1968)

KIRILLOV, S.V., Y.P. SEMENKOV: Interaction of tRNA with ribosomes. Mol. Biol. 18, 1013-1025 (1985)

KOTELIANSKY, V.E., S.P. DOMOGATSKY, A.T. GUDKOV, A.S. SPIRIN: Elongation factor-dependent reactions on ribosomes derived of protein L7 and L12. FEBS Lett. 73, 6-11 (1977)

KRAYEVSKY, A.A., M.K. KUKHANOVA: The peptidyl-transferase center of ribosomes. Nucl. Ac. Res. Mol. Biol. 23, 1-55 (1979)

LAEMMLI, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685 (1970)

LAURSEN, R.A., J.J. L'ITALIEN, S. NAGARKATTI, D.L. MILLER: The amino acid sequence of elongation factor Tu of Escherichia coli. J. Biol. Chem. 256, 8102-8109 (1981)

LEBERMAN, R., B. ANTONSSON, R. GIOVANELLI, R. GUARIGUATA, R. SCHUMANN, A. WITTINGHOFER: A simplified procedure for the isolation of bacterial polypeptide elongation factor EF-Tu. Anal. Biochem. 104, 29-36 (1980)

LEBERMAN, R., U. EGNER: Homologies in the primary structure of GTP-binding proteins: The nucleotide-binding site of EF-Tu and p21. EMBO J. 3, 339-341 (1984)

LIPMANN, F.: Polypeptide chain elongation in protein biosynthesis. Science 164, 1024-1031 (1969)

LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, R.J. RANDALL: Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

LUCAS-LENARD, J., A.L. HAENNI: Release of transfer RNA during peptide chain elongation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 93-97 (1969)

LUCAS-LENARD, J., L. BERES: Protein synthesis - peptide chain elongation. In: The enzymes (P.D. Boyer, ed.), Vol. X, 53-86 New York: Academic Press 1974

MAKAROV, E.M., V.I. KATHNIN, V.B. ODINTSOV, Y.P. SEMENKOV, S.V. KIRILLOV: How do the binding sites of the ribosome distinguish functional forms of tRNA? Mol. Biol. 18, 1090-1094 (1985)

MARSH, R.C., G. CHINALI, A. PARMEGGIANI: Function of sulfhydryl groups in ribosome-elongation factor G reactions. J. Biol. Chem. 250, 8344-8352 (1975)

MATZKE, A.J.M., A. BARTA, E. KUECHLER: Relative arrangement of tRNA and mRNA on the ribosome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5110-5114 (1980)

McCORMICK, F., B.F.C. CLARK, T.F.M. LA COUR, M. KJELDGAARD, L. NORSKOV-LAURITSEN, J. NYBORG: A model for the tertiary structure of p21, the product of the ras oncogene. Science 230, 78-82 (1985)

MILLER, D.L., J. HACHMANN, H. WEISSBACH: The reactions of the sulfhydryl groups on the elongation factors Tu and Ts. Arch. Biochem. Biophys. 144, 115-121 (1971)

MILLER, D.L., H. WEISSBACH: Elongation factor Tu and the aminoacyl-tRNA·EF-Tu·GTP complex. In: Methods in enzymology (K. Moldave, L. Grossmann, eds.), Vol. XXX, 219-232 New York: Academic Press 1974

MODOLELL, J., T. GIRBES, D. VAZQUEZ: Ribosomal translocation promoted by guanylylimido diphosphate and guanyl-methylene diphosphonate. FEBS Lett. 60, 109-113 (1975)

MONRO, R.E., T. STAEHLIN, M.L. CELMA, D. VAZQUEZ: The peptidyltransferase activity of ribosomes. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 34, 357-366 (1969)

NAKAMURA, S., S. OHTA, K.-I. ARAI, N. ARAI, T. OSHIMA, Y. KAZIRO: Studies on polypeptide chain elongation factors from an extreme thermophile Thermus thermophilus HB8 3. Molecular properties. Eur. J. Biochem. 92, 533-543 (1978)

NIERHAUS, K.H., H.-J. RHEINBERGER: An alternative model for the elongation cycle of protein biosynthesis. Trends Biol. Sci. 9, 428-432 (1984)

NILSSON, L., O. NYGARD: Localization of the sites of ADP-ribosylation and GTP binding in the eukaryotic elongation factor EF-2. Eur. J. Biochem. 148, 299-304 (1985)

NISHIZUKA, Y., F. LIPMANN: The interrelationship between GTPase and amino acid polymerization. Arch. Biochem. Biophys. 116, 344-351 (1966)

NOMURA, M., P. TRAUB, H. BECHMANN: Hybrid 30S ribosomal particles reconstituted from components of different bacterial origin. Nature 219, 793-799 (1968)

OKURA, A., T. KINOSHITA, N. TANAKA: Complex formation of fusidic acid with G factor, ribosome and guanosine nucleotide. Biochem.

Biophys. Res. Commun. 41, 1545-1550 (1970)

OKURA, A., T. KINOSHITA, N. TANAKA: Formation of fusidic acid-G factor-GDP-ribosome complex and the relationship to the inhibition of GTP hydrolysis. J. Antibiotics 24, 656-660 (1971)

OSAWA, S., H. HORI: Molecular evolutions of ribosomal components. In: Ribosomes: Structure, function and genetics. (G. Chambliss, G.R. Craven, J. Davies, K. Davis, L. Kahan, M. Nomura, eds.), Baltimore, University Park Press (1980)

OVCHINIKOV, Y.A., Y.B. ALAKHOV, Y.P. BUNDULIS, N.V. DOVGAS, V.P. KOZLOV, L.P. MOTUZ, L.M. VINOKUROV: The primary structure of elongation factor G from Escherichia coli. FEBS Lett. 139, 130-135 (1982)

PAO, C.C., J. FLECKENSTEIN, B.T. DYESS: Role of peptide chain elongation factor G in guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate synthesis. J. Bacteriol. 145, 429-433 (1981)

PARMEGGIANI, A., C. SINGER, E.M. GOTTSCHALK: Purification of the amino acid polymerization factors from Escherichia coli. In: Methods in enzymology (K. Moldave, L. Grossman, eds.), Vol. XX, 291-302, New York: Academic Press, 1971

PINGOUD, A., W. BLOCK, H. WOLF: The antibiotics kirromycin and pulvomycin bind to different sites on the elongation factor Tu from E.coli. Eur. J. Biochem. 123, 261-265 (1982)

POLLET, R.J., B.A. HAASE, M.L. STANDAERT: Macromolecular characterization by sedimentation equilibrium in the prerarative ultracentrifuge. J. Biol. Chem. 254, 30-33 (1979)

RAVEL, J.M., R.L. SHOREY, W. SHIVE: Evidence for a guanine nucleotide-aaRNA complex as intermediate in the enzymic transfer of aaRNA to ribosomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 29, 68-73 (1967)

RHEINBERGER, H.-J., K.H. NIERHAUS: Testing an alternative model for the ribosomal peptide elongation cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4213-4217 (1983)

RHEINBERGER, H.-J., S. SCHILLING, K.H. NIERHAUS: The ribosomal elongation cycle: tRNA binding, translocation and tRNA release. Eur. J. Biochem. 134, 421-428 (1983a)

RIDDLE, D.L., J. CARBON: Frameshift suppresion: a nucleotide addition in the anticodon of a glycine transfer RNA. Nature New Biol. 242, 234 (1973)

ROHRBACH, M.S., M.E. DEMPSEY, J.W. BODLEY: Preparation of homogenous elongation factor G and examination of the mechanism of guanosine triphosphate hydrolysis. J. Biol. Chem. 249, 5094-5101 (1974)

RUTKEVITCH, N.M., L.P. GAVRILOVA: Factor-free and one-factor-promoted Poly(U,C)-dependent synthesis of polypeptides in cell-free systems of Escherichia coli. FEBS Lett. 143, 115-118 (1982)

SACERDOT, C., P. DESSEN, J.W.B. HERSHEY, J.A. PLUMBRIDGE, M. GRUNBERG-MANAGO: Sequence of the initiation factor IF-2 gene: unusual protein features and homologies with elongation factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7787-7791 (1984)

SCOLNICK, E.M., A.G. PAPAGEORGE, T.Y. SHIH: Guanine nucleotide-binding activity as an assay for src protein of rat-derived murine sarcoma viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5355-5359 (1979)

SKAR, D.C., M.S. ROHRBACH, J.W. BODLEY: Limited trypsinolysis of native Escherichia coli elongation factor G. Biochem. 14, 3922-3926 (1975)

SPIRIN, A.S.: A model of the functioning ribosome: Locking

and unlocking of the ribosome subparticles. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 34, 197-207 (1969)

SPIRIN, A.S.: Testing the classical two-tRNA-site model for the ribosomal elongation cycle. FEBS Lett. 165, 280-283 (1984)

SPIRIN, A.S.: Ribosomal translocation: Facts and models. Progr. Nucl. Ac. Res. Mol. Biol. 32, 75-114 (1985)

SPIRIN, A.S.: Ribosome structure and protein biosynthesis. The Benjamin/Cummings Publ. Comp., Inc., Menlo Park, California (1986)

SPRINZL, M., F. CRAMER: The -C-C-A-end of tRNA and its role in protein biosynthesis. Progr. Nucl. Ac. Res. Mol. Biol. 22, 1-69 (1979)

STAEHLIN, T., D.R. MAGLOTT: Preparation of Escherichia coli ribosomal subunits active in polypeptide synthesis. In: Methods in enzymology (K. Moldave, L. Grossman, eds.), Vol. XX, 449-456, New York: Academic Press, 1971

STRYER, L., J.B. HURLEY, B. FUNG: Transducin, an amplifier protein in vision. Trends Biochem. Sci. 6, 245-247 (1981)

STULBERG, M.P.: The isolation and properties of phenylalanyl ribonucleic acid synthetase from Escherichia coli B. J. Biol. Chem. 242, 1060-1064 (1967)

TEUBER, M.: Genetic engeneering with Lactobacteria. Swiss Biotech. 4, 16-18 (1986)

TISCHENDORF, G., M. GEISSER, G. STÖFFLER, H.G. WITTMANN: Comparison of ribosomal RNA-binding protein L2 isolated from different bacterial species. Molec. gen. Genet. 127, 147-156 (1973)

TOCCHINI-VALENTINI, G.P., E. MATTOCCIA: A mutant of E.coli with an altered supernatant factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 61, 146-151 (1968)

TRAUT, R.R., R.E. MONRO: The puromycin reaction and its relation to protein synthesis. J. Mol. Biol. 10, 63-72 (1964)

VAN DE KLUNDERT, J.A.M., P.H. VAN DER MEIDE, P. VAN DE PUTTE, L. BOSCH: Mutants of Escherichia coli altered in both genes coding for the elongation factor Tu. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4470-4473 (1978)

VAZQUEZ, D.: Inhibitors of protein biosynthesis. Molecular biology, biochemistry and biophysics Bd. 30, Springer-Verlag Berlin·Heidelberg·New York, 1979

VOORMA, H.O., R. BENNE, T.J.A. DEN HERTOG: Binding of aminoacyl-tRNA to ribosomes programmed with bacteriophage MS2 RNA. Eur. J. Biochem. 18, 451-462 (1971)

WALLER, J.P., J.I. HARRIS: Studies on the composition of the protein from E.coli ribosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 47, 18-23 (1961)

WASILIU, M.: Kirromycin- und Pulvomycin-resistenter Elongationsfaktor Tu aus Lactobacillus acidophilus. Diplomarbeit, Univ. Tübingen (1983)

WATSON, J.D.: The synthesis of proteins upon ribosomes. Bull. Soc. Chim. Biol. 46, 1399-1425 (1964)

WEBER, K., M. OSBORN: The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406-4412 (1969)

WILSON, G.E., M. COHN, D. MILLER: Magnetic resonance studies of interactions of spin-labeled elongation factor Tu with ligands. J. Biol. Chem. 253, 5764-5768 (1978)

WITTINGHOFER, A., R. GUARIGUATA, R. LEBERMAN: Bacterial elongation factor Ts: Isolation and reactivity with elongation f factor Tu. J. Bact. 153, 1266-1271 (1983)

WITTMANN, H.G.: Purification and identification of Escherichia coli ribosomal proteins. In: Ribosomes (M. Nomura, A. Tissières and P. Lengyel, eds.), 93-114. Cold Spring Harbour, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1974.

WÖRNER, W.: Heterogenität der Elongationsfaktoren bei Eubakterien - Eine strukturelle und funktionelle Charakterisierung. Dissertation, Univ. Tübingen (1982)

WÖRNER, W., C. GLÖCKNER, M. MIERZOWSKI, H. WOLF: On heterogenety of elongation factor Tu among Eubacteria. FEMS Micribiol. Lett. 18, 69-73 (1983)

WOLF, H., H. ZÄHNER: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, 99. Mitteilung: Kirromycin. Arch. Mikrobiol. 83, 147-154 (1972)

WOLF, H., G. CHINALI, A. PARMEGGIANI: Kirromycin, an inhibitor of protein biosynthesis that acts on elongation factor Tu. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 4910-4914 (1974)

WOLF, H., D. ASSMANN, E. FISCHER: Pulvomycin, an inhibitor of protein biosynthesis preventing ternary complex formation between elongation factor Tu, GTP and aminoacyl-tRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5324-5328 (1978)

WOLF, H., E. FISCHER: Kirromycin and related antibiotics. In: Antibiotics VI, Modes and mechanisms of microbial growth inhibitors, (F.E. Kahn, ed.), 71-89, Springer-Verlag Berlin·Heidelberg·New York, 1983

YANG, C., D. SÖLL: Covalent attachment of fluorescent groups to transfer ribonucleic acid. Reactions with 4-Bromomethyl-7 Methoxy-2-oxo-2H-benzopyran. Biochem. 13, 3615-3621 (1974)

ZIEF, M., R. WOODSIDE, H. SCHMITZ: Pulvomycin. Antibiot. Chemother. 7, 384-389 (1957)

ZIERHUT, G., W. PIEPERSBERG, A. BÖCK: Comparative analysis of the effect of aminoglycosides on bacterial protein synthesis in vitro. Eur. J. Biochem. 98, 577-583 (1979)

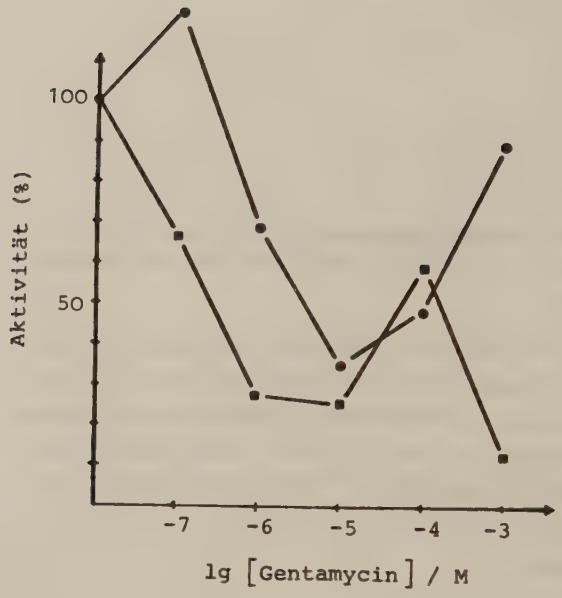
VII. A N H A N G

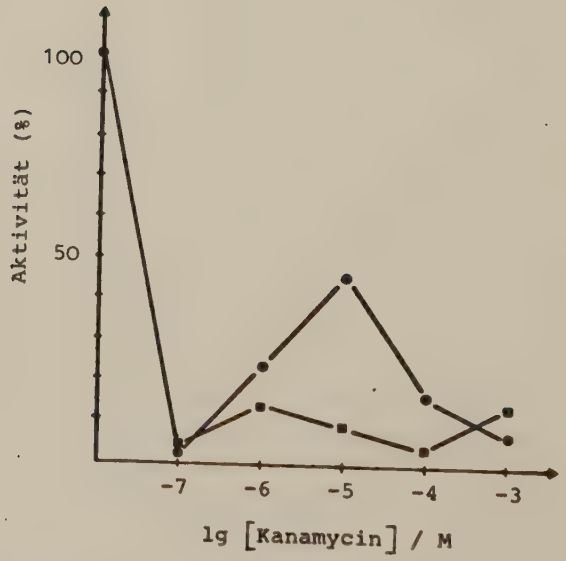
Anhang zu Tabellen 4, 5 und 6

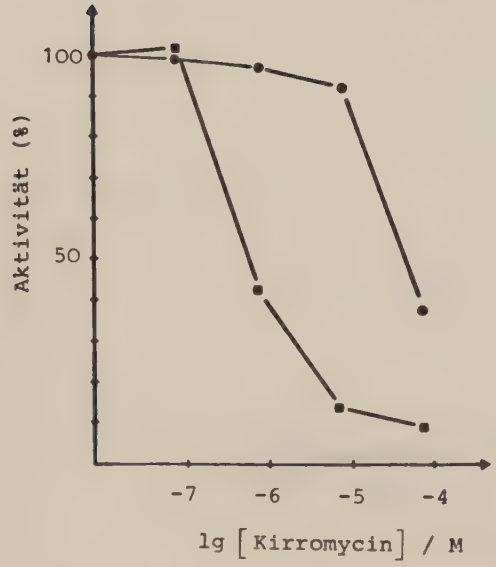
Hemmung der Poly(U)-abhängigen Poly(Phe)-Synthese durch Antibiotika, die in die Elongationsphase der Proteinbiosynthese eingreifen.

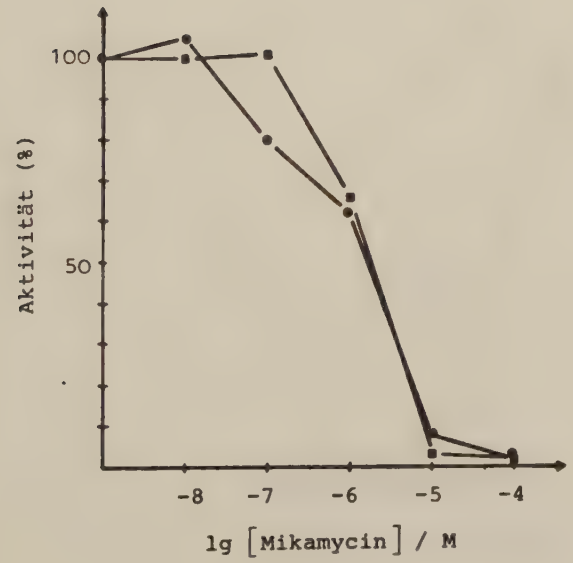
Die Durchführung der Poly(Phe)-Synthese erfolgte wie in Abschnitt II.12.D beschrieben. Bestimmt wurde der Einbau von [^{14}C]-Phenylalanin in Trichloressigsäure-unlösliches Poly(Phe). Die Angaben in den folgenden Abbildungen beziehen sich auf den Einbau von [^{14}C]-Phenylalanin in Abwesenheit der Antibiotika (100%).

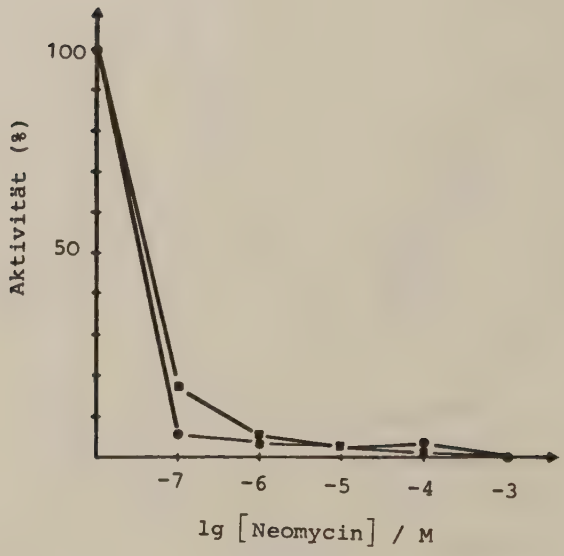
E.coli: (■); L.casei: (●)

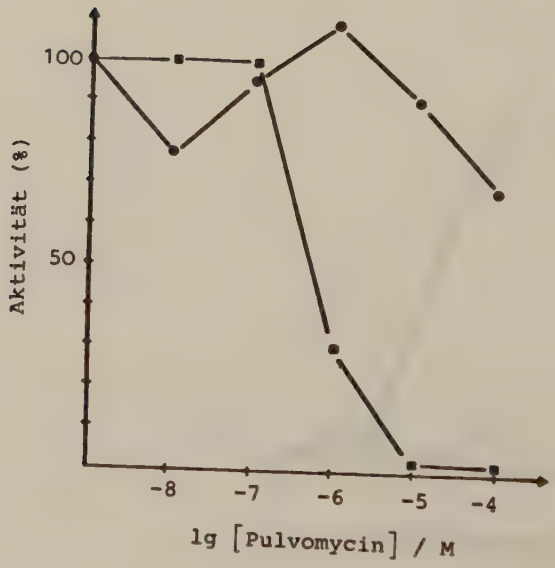

100
50
Aktivität (%)
-7
-6
-5
-4
-3
lg [Gentamycin] / M

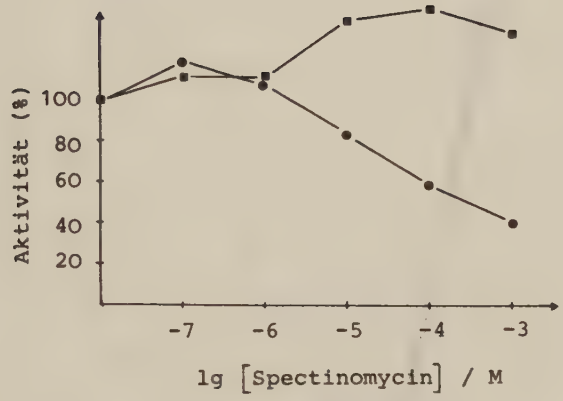

100
50
Aktivität (%)
-7
-6
-5
-4
-3
lg [Kanamycin] / M

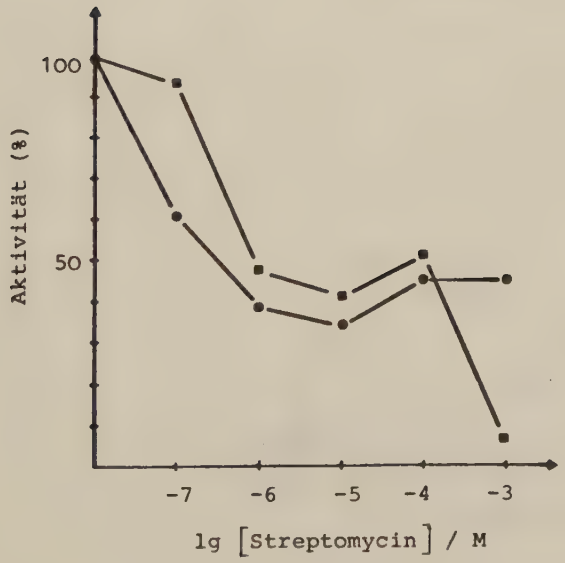

100
50
Aktivität (%)
-7
-6
-5
-4
lg [Kirromycin] / M

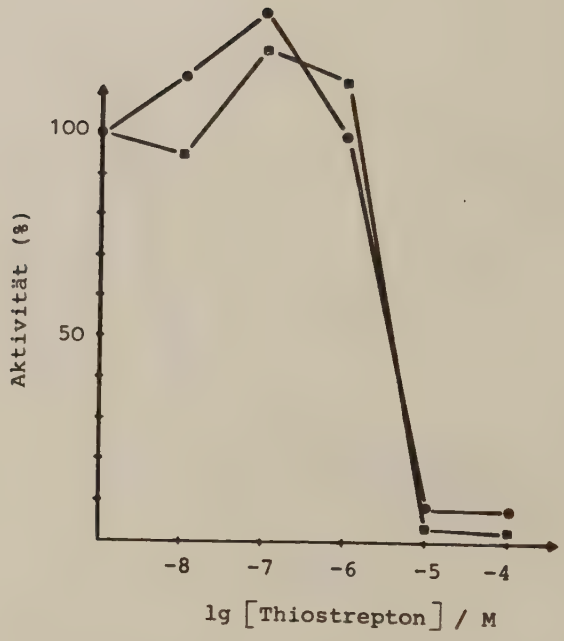

100
50
Aktivität (%)
-8
-7
-6
-5
-4
lg [Mikamycin] / M

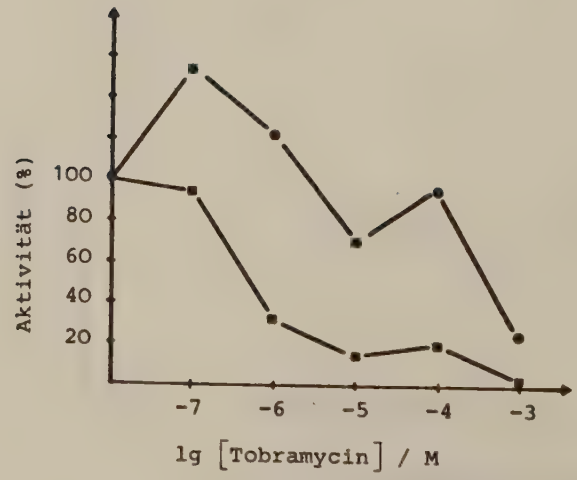

100
50
Aktivität (%)
-7
-6
-5
-4
-3
lg [Neomycin] / M

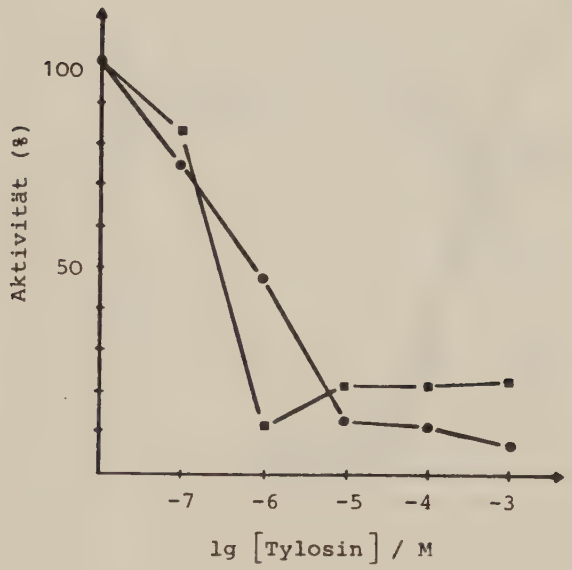

100
50
Aktivität (%)
-8
-7
-6
-5
-4
lg [Pulvomycin] / M

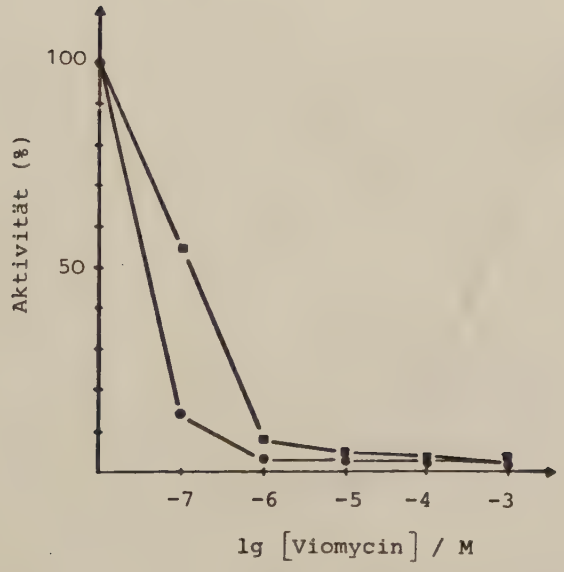

Aktivität (%)
100
80
60
40
20
-7
-6
-5
-4
-3
lg [Spectinomycin] / M

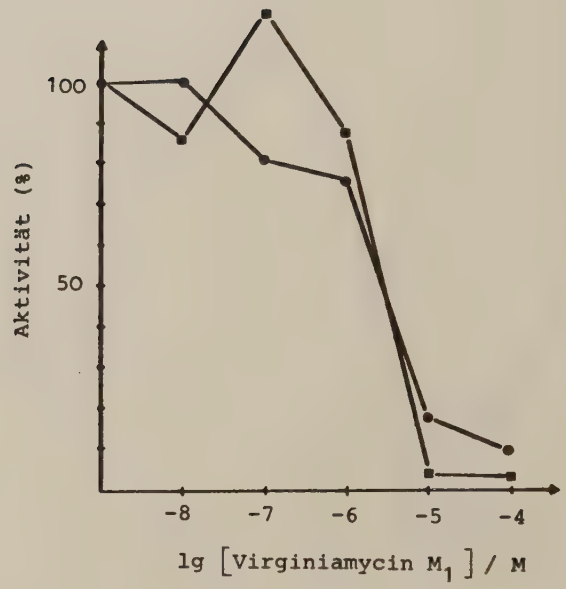

Aktivität (%)
100
50
-7
-6
-5
-4
-3
lg [Streptomycin] / M

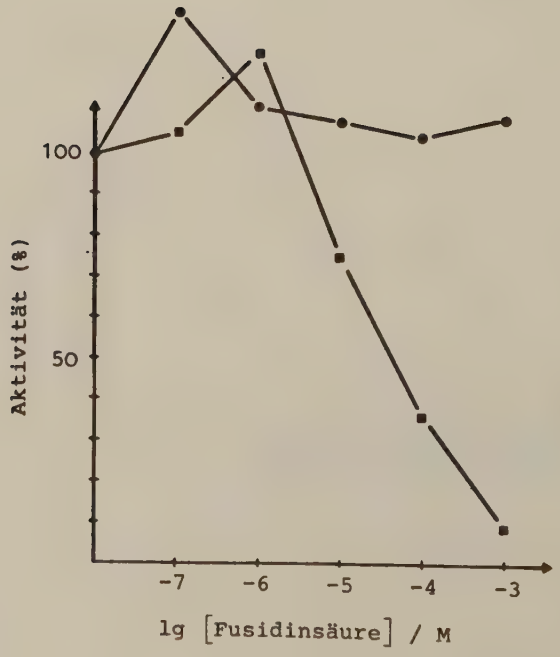

100
50
Aktivität (%)
-8
-7
-6
-5
-4
lg [Thiostrepton] / M

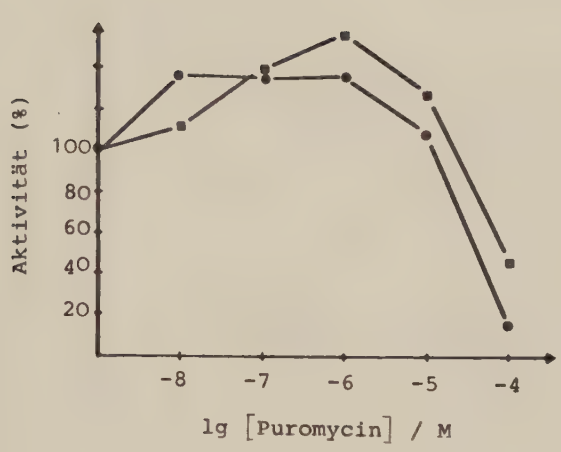

100
80
60
40
20
Aktivität (%)
-7
-6
-5
-4
-3
lg [Tobramycin] / M

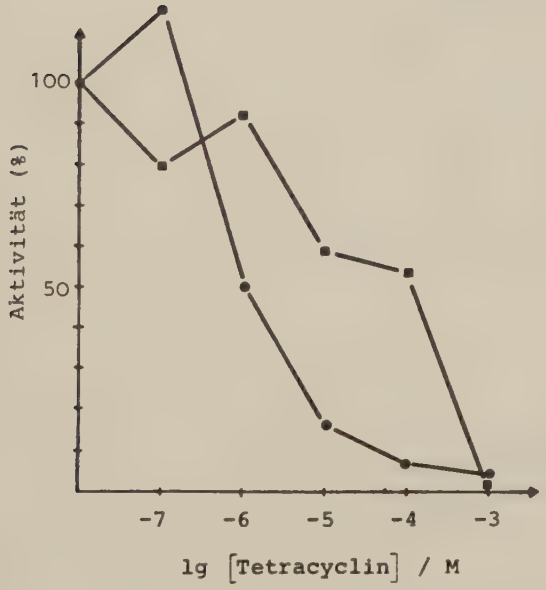

100
50
Aktivität (%)
-7
-6
-5
-4
-3
lg [Tylosin] / M

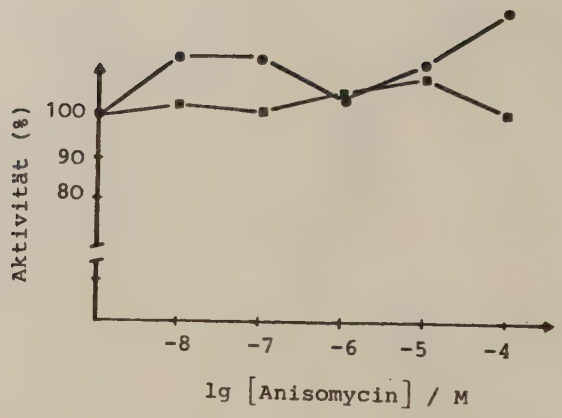

100
50
Aktivität (%)
-7
-6
-5
-4
-3
lg [Viomycin] / M

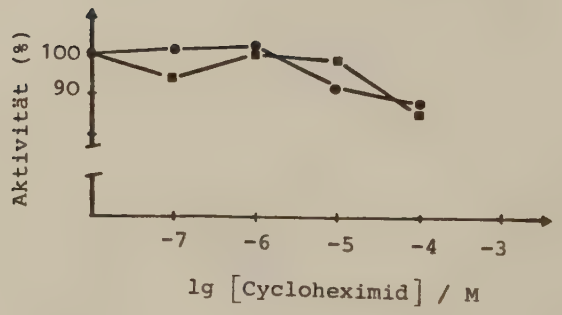

100
50
Aktivität (%)
-8
-7
-6
-5
-4
lg [Virginiamycin M_1] / M

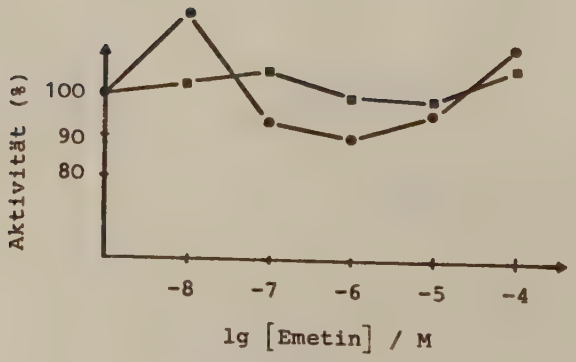

100
50
Aktivität (%)
-7
-6
-5
-4
-3
lg [Fusidinsäure] / M

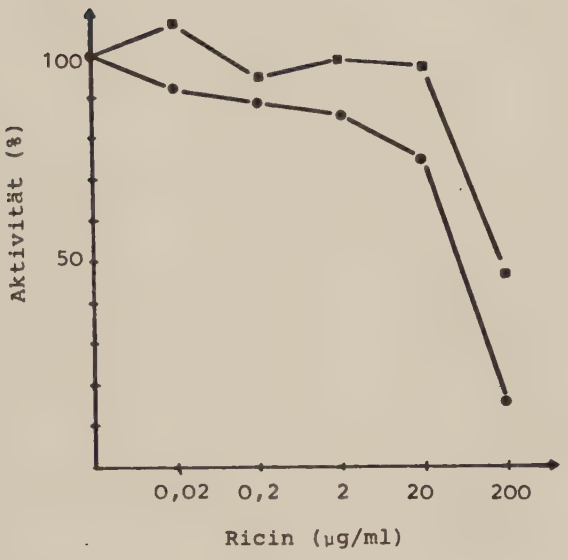

Aktivität (%)
100
80
60
40
20
-8
-7
-6
-5
-4
lg [Puromycin] / M


Aktivität (%)
100
50
-7
-6
-5
-4
-3
lg [Tetracyclin] / M


Aktivität (%)
100
90
80
-8
-7
-6
-5
-4
lg [Anisomycin] / M


Aktivität (%)
100
90
-7
-6
-5
-4
-3
lg [Cycloheximid] / M


Aktivität (%)
100
90
80
-8
-7
-6
-5
-4
lg [Emetin] / M


100
50
Aktivität (%)
0,02
0,2
2
20
200
Ricin (µg/ml)

Lebenslauf

Michael Wasiliu
geboren am 13. August 1957 in Stuttgart

April 1964 - Juli 1967	Heusteigschule Stuttgart
August 1967 - Mai 1976	Schickhardt-Gymnasium Stuttgart
19. Mai 1976	Reifeprüfung
ab Oktober 1976	Studium der Biochemie an der Universität Tübingen
Oktober 1977	1. Teil der Diplomvorprüfung
September 1979	2. Teil der Diplomvorprüfung
15. November 1983	Diplomprüfung in Biochemie

Ab April 1984 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Biologie II, Lehrbereich Mikrobiologie I, der Universität Tübingen unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Wolf.

Akademische Lehrer:

E. Bayer, K. Eisele, K. Grell, J. Guglielmi, H. Krüger,
H. Mauser, D. Mecke, H. Metzner, H. Ninnemann, H. Pommer,
H. Probst, K. Reutter, W. Seyffert, G. Staudt, J. Strähle,
W. Voelter, U. Weber, A. Wendel, U. Weser, H. Wolf,
H. Zähner

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45